

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Utilisation de la technique des gels d'électrophorèse en deux dimensions pour confirmer l'effet d'accélération du vieillissement in vitro induit par le stress

Collin, Frédérique

*Award date:*  
1992

*Awarding institution:*  
Université de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

011 292

UNITE DE BIOCHIMIE CELLULAIRE

Année académique 1992-1993

Promoteur : J.REMACLE

UTILISATION DE LA TECHNIQUE DES GELS  
D'ELECTROPHORESE EN DEUX DIMENSIONS  
POUR CONFIRMER L'EFFET D'ACCELERATION  
DU VIEILLISSEMENT *IN VITRO*  
INDUIT PAR LES STRESS.

Frédérique  
COLLIN

**Utilisation de la technique des électrophorèses en  
deux dimensions pour confirmer l'effet d'accélération  
du vieillissement *in vitro* induit par les stress.**

COLLIN Frédérique

**Résumé**

Le but de ce mémoire était de confirmer biochimiquement les données morphologiques qui suggèrent d'abord que les fibroblastes WI-38 peuvent évoluer au cours de leur vieillissement en passant par différents états stationnaires et ensuite, que les stress cellulaires peuvent accélérer ce passage. Enfin, nous avons recherché des arguments en faveur d'une difficulté accrue des cellules vieilles à réagir contre un stress.

Après avoir recherché des conditions expérimentales de stress pour obtenir des populations de cellules âgées à partir de cellules jeunes, les données obtenues par analyse des gels en deux dimensions montrent que les distributions de certaines protéines des lysats cellulaires connaissent une évolution quantitative et qualitative similaire pour les cellules stressées et les cellules âgées.

Ensuite, nous présentons des arguments en faveur d'une diminution des capacités de synthèse protéique par les cellules vieilles juste après un stress. En ce qui concerne la dégradation des protéines par les cellules vieilles juste après un stress, d'autres expériences seraient nécessaires pour confirmer une diminution.

En conclusion, nous possédons actuellement des éléments de réflexion qui permettent à la fois de confirmer et de mieux nuancer le modèle théorique selon lequel la cellule connaît une réorganisation globale après un stress ou lors du vieillissement, accompagnée d'une diminution des fonctions cellulaires.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques (Zoologiques)  
Décembre 1992

**Promoteur** : Professeur J. Remacle

Au terme de ce mémoire, je tiens tout d'abord à remercier le Capitaine J. Remacle de m'avoir accueillie sur son "bateau" et de m'avoir donné de judicieux conseils tout au long de cette année et notamment celui de la précision que tout bon marin doit connaître pour parvenir au but de son voyage.

Merci à toi Olivier de m'avoir guidée durant cette courte année aussi bien à travers la houle que parmi une mer d'huile et d'avoir toujours été à mes côtés pour tenir la barre quand je perdais le nord. Ton enthousiasme, ta bonne humeur, et ton sens humain ont rendu cette traversée encore plus agréable que je ne l'avais espéré et par moment elle prenait visage de croisière. Dommage que le voyage fut si court...

Embarquer sur mon bateau et oublier Andrée au port m'aurait sûrement condamnée au naufrage. Ton expérience, ton sourire de tous les jours, ta disponibilité constante, et surtout ton énorme gentillesse ont fait de toi une batelière formidable.

Je n'oublierai pas non plus mon cartographe irremplaçable Edouard Delaive qui m'a appris petit à petit à lire une "carte" et à repérer les points à ne pas omettre pour diriger mon bateau.

Merci aussi à tous mes compagnons de voyage Barbara, Marie, Muriel, Patsy et Frédéric qui comme moi depuis cinq ans suivent la même école de navigation et qui savent très bien qu'en cas de galère, il y en a toujours un pour rassurer l'autre.

Merci à tout l'équipage du bateau et plus particulièrement à Isabelle, Marc, Nathalie et Sylvianne pour leur aide qui, lorsque j'ai abordé les derniers jours de traversée m'ont aidée à éviter que la catastrophe n'arrive en m'aidant à sécher l'eau qui envahissait les cales.

Merci à mes parents et surtout à maman qui a été mon étoile polaire durant toutes mes études et dont l'amour et la tolérance m'ont fait grandir un peu plus chaque jour.

Une pensée toute particulière et remplie de tendresse pour toi Oli, qui a été le soleil de ma traversée durant ces cinq ans (bien que parfois caché par les nuages...) et qui j'espère le restera jusqu'au bout de mon voyage de vie.



## Abréviations biochimiques.

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

ARNt : acide ribonucléique de transfert

ATP : adénosine triphosphate

BME + S : milieu de base de Eagle + sérum foetal bovin (10% v/v)

DMSO : diméthylsulfoxyde

IEF : iso-électrofocalisation

IOD : intégration de la densité optique

% IOD : pourcentage de l'intégration de la densité optique

Lbr : tampon de lyse

MF : fibroblastes mitotiques de types I à III

NEPHGE : "nonequilibrium pH gradient electrophoresis" : électrophorèse dont le gradient de pH est non équilibré

PBS : phosphate buffer saline

PI : point isoélectrique

PM : poids moléculaire

PMF IV à VII : fibroblastes post-mitotiques de types IV à VII

Pré-IEF : pré-focalisation

ROO : radicaux hydroperoxydes

ROOH : hydroperoxydes lipidiques

SDS : dodécyl sulfate de sodium

SOD : superoxyde dismutase

TBHP : tert-butylhydroperoxyde

U.V : ultra-violet

kDa : kilo-Dalton

## Abréviations thermodynamiques.

$dxP$  : excès de production d'entropie

$E$  : énergie

$G$  : grandeur thermodynamique extensive

$J_j$  : flux

$L_{jj}$  : coefficient phénoménologique

$M$  : masse

$P = P(s)$  : production d'entropie

$P^0$  : valeur minimale de production d'entropie

$S$  : entropie

$s$  : production d'entropie sur un élément de volume

$X_j$  : forces

# PLAN

## I. INTRODUCTION

### 1. Les théories du vieillissement cellulaire

#### 1.1. Théories génétiques

##### 1.1.1. Théories génétiques et déterministes

##### 1.1.2. Théories génétiques et stochastiques

#### 1.2. Théories environnementales

##### 1.2.1. Hypothèse de l'erreur catastrophique

##### 1.2.2. Théorie généralisée de l'erreur catastrophique

##### 1.2.3. Conclusion

### 2. Le concept de seuil critique d'accumulation d'erreurs

### 3. Thermodynamique et vieillissement

#### 3.1. Applicabilité de la thermodynamique aux systèmes irréversibles

#### 3.2. Systèmes ouverts proches de l'équilibre

#### 3.3. Systèmes ouverts loin de l'équilibre

#### 3.4. Evolution des systèmes ouverts en fonction du temps

#### 3.5. Implication de la thermodynamique pour le vieillissement cellulaire

##### 3.5.1. Effet des stress stochastiques

##### 3.5.2. Influence du génome

#### 3.6. Conclusion

### 4. Le modèle expérimental : les fibroblastes WI-38

#### 4.1. Le comportement des fibroblastes embryonnaires en culture

#### 4.2 Existence d'une relation inverse entre l'âge du donneur de cellules et la longévité atteinte en culture

#### 4.3. Pourquoi avoir choisi les fibroblastes comme modèle expérimental pour l'étude du vieillissement *in vitro* ?

### 5. Effets des stress sur le vieillissement cellulaire *in vitro* : applications du modèle théorique

## 6. Toxicité de l'éthanol et du tert-butylhydroperoxyde (TBHP)

### 6.1. Toxicité de l'éthanol

- 6.1.1. Effet de l'éthanol sur l'augmentation de la perméabilité au calcium du réticulum sarcoplasmique du muscle strié squelettique
- 6.1.2. Effet de l'éthanol sur l'induction des peroxydations lipidiques, la mobilisation du fer et la génération des radicaux libres
- 6.1.3. Influence de l'éthanol sur la fluidité membranaire et la migration des cellules tumorales
- 6.1.4. Effets temporels de l'éthanol au niveau des fibroblastes de poumon foetal humain
- 6.1.5. Conclusion

### 6.2. Toxicité du tert-butylhydroperoxyde (TBHP)

## 7. Les gels d'électrophorèse en deux dimensions

### 7.1. Introduction

### 7.2. Commentaires importants

- 7.2.1. Effet du stockage et de la température sur les échantillons
- 7.2.2. La capacité de chargement
- 7.2.3. Equilibration du gel dans le tampon de la deuxième dimension
- 7.2.4. Sensibilité et détection
- 7.2.5. Pourcentage de radioactivité initialement appliquée retrouvée dans la seconde dimension
- 7.2.6. Reproductibilité
- 7.2.7. Distribution des protéines
- 7.2.8. Les ampholines
- 7.2.9. Hétérogénéité des charges
- 7.2.10. Artéfacts possibles
- 7.2.11. Comparaison de mélanges complexes de protéines
- 7.2.12. Utilisation de marqueurs et de coordonnées ou comment outrepasser l'inconvénient majeur des électrophorèses en deux dimensions

### 7.3. Conclusion

## II. OBJECTIFS

## III. MATERIELS ET METHODES

### 1. Cultures de fibroblastes

- 1.1. Les fibroblastes WI-38.
- 1.2. Décongélation et mise en culture.
- 1.3. Composition du milieu de culture.



- 1.4. Méthode de culture des fibroblastes.
2. Etude de l'effet de stress cellulaires multiples.
3. Détermination des types morphologiques.
4. Stress multiples.
5. Incorporation de la méthionine radioactive.
6. Electrophorèses à deux dimensions.
  - 6.1. Solutions pour la première dimension.
    - 6.1.1. Tampon de lyse
    - 6.1.2. Acrylamide solution IEF (D)
    - 6.1.3. Solution NP40 (E)
    - 6.1.4. Solution de recouvrement du gel (H)
    - 6.1.5. Solution de recouvrement de l'échantillon (KBr)
    - 6.1.6. SDS Sample buffer (O)
    - 6.1.7. Anolyte ( $H_3PO_4$ )
    - 6.1.8. Catholyte (NaOH)
  - 6.2. Solutions pour la seconde dimension.
    - 6.2.1. Gel à 10% d'acrylamide
    - 6.2.2. Gel de concentration
    - 6.2.3. Tampon d'électrophorèse
    - 6.2.4. Solution de conservation des gels.
    - 6.2.5. Solution d'agarose 1%
  - 6.3. Procédure pour la première dimension.
    - 6.3.1. Lavage des tubes
    - 6.3.2. Effilement des pipettes Pasteur
    - 6.3.3. Polymérisation de la première dimension
    - 6.3.4. Pré-focalisation
    - 6.3.5. Conditions de pré-focalisation
    - 6.3.6. Focalisation isoélectrique
    - 6.3.7. Equilibration de la première dimension pour la seconde dimension
  - 6.4. SDS-PAGE : Seconde dimension
    - 6.4.1. Lavage des plaques
    - 6.4.2. Montage des plaques
    - 6.4.3. Polymérisation du gel SDS
    - 6.4.4. Fabrication des gels
    - 6.4.5. Dépôt de la première dimension sur la seconde dimension
    - 6.4.6. Démontage des plaques
  - 6.5. Traitement des gels pour l'autoradiographie



6.6. Révélation du film photo

6.7. Analyse des gels

#### 7. Estimation de la synthèse totale des protéines

7.1. Réactifs utilisés

7.2. Mode opératoire

#### 8. Estimation de la dégradation totale des protéines

8.1. Réactifs utilisés

8.2. Mode opératoire

### IV. RESULTATS

#### 1. Introduction

#### 2. Détermination des proportions des divers types morphologiques en fonction des passages en culture

#### 3. Analyse des gels d'électrophorèse en deux dimensions

#### 4. Comparaison des cartes protéiques

4.1. Protéines spécifiques d'un passage âgé

4.2. Protéines dont la synthèse est induite dès les passages intermédiaires

4.3. Protéines dont la synthèse diminue quand la cellule aborde les derniers passages en culture

#### 5. Conclusions

#### 6. Recherche des conditions optimales de stress pour l'analyse des proportions des divers types morphologiques

6.1. Cellules repiquées en boîtes multi-compartmentées et stressées sous TBHP  $2,5 \cdot 10^{-3}$  M et  $5 \cdot 10^{-3}$  M

6.2. Cellules repiquées en boîtes de Pétri et stressées sous TBHP  $2,5 \cdot 10^{-3}$  M et  $5 \cdot 10^{-3}$  M

6.3. Evolution des proportions des types cellulaires après cinq stress succesifs sous éthanol 6, 7 et 8%

6.3.1. Evolution des proportions des morphotypes après cinq stress successifs sous éthanol 6%

6.3.2. Evolution des proportions des divers morphotypes après cinq stress successifs sous éthanol 7%.

6.3.3. Evolution des proportions des divers morphotypes après cinq stress successifs sous éthanol 8%.

## 7. Comparaison des cartes protéiques après les stress

7.1. Mise en évidence de polypeptides communs entre le passage 46, Eth 5 str et TBHP 3 str

7.1.1. Détermination des PM

7.1.2. Détermination des % IOD

7.2. Conclusions.

## 8. Estimation de la synthèse totale et de la dégradation totale des protéines en conditions normales ou après un stress

8.1. Estimation de la synthèse totale des protéines chez des cellules de divers passages

8.2. Estimation de la synthèse totale des protéines après une heure de stress sous TBHP  $5 \cdot 10^{-3}$  M

8.3. Estimation de la dégradation totale des protéines pour des cellules de passage 28, 38 et 43.

8.4. Estimation de la dégradation totale des protéines après une heure de stress sous TBHP  $5 \cdot 10^{-3}$  M

## V. DISCUSSION ET CONCLUSION

## VI. BIBLIOGRAPHIE

## I. INTRODUCTION

### 1. Les théories du vieillissement cellulaire

Les théories du vieillissement cellulaire peuvent être classées en deux catégories : les théories environnementales et les théories génétiques.

La première catégorie donne un rôle prépondérant aux effets néfastes de l'environnement cellulaire ; quant à la seconde, elle tient compte d'un aspect de l'expression ou de la structure du génome.

Les théories génétiques peuvent être déterministes ou stochastiques, les théories environnementales sont toutes stochastiques.

Rappelons qu'un phénomène est régi par des lois stochastiques s'il comporte des variables aléatoires qui font que ce phénomène est en partie le fruit du hasard et doit être étudié en faisant appel à des calculs probabilistes.

Tout à l'inverse, un phénomène sera gouverné par des lois déterministes si un nombre limité de variables connues permettent de le décrire et évoluent exactement de la même manière à chaque occurrence du phénomène considéré, sans faire appel à un calcul probabiliste.

Considérons tout d'abord les théories génétiques.

#### 1.1. Théories génétiques

##### 1.1.1. Théories génétiques et déterministes

La complexité du système cellulaire étant tellement forte, peut-on concevoir des théories du vieillissement cellulaire qui soient réellement déterministes?

En réalité, pour que le vieillissement puisse s'expliquer par des théories qui soient à la fois génétiques et déterministes, il doit exister un nombre restreint de gènes présents tout au cours de la vie d'une cellule ou d'un clone cellulaire et qui régit le vieillissement.

Ces gènes seront soit responsables d'une cascade d'expressions et/ou de répressions s'enchaînant au cours de la vie depuis la formation de l'oeuf, soit être capables de déterminer un moment à partir duquel certains gènes s'allumeront ou s'éteindront entraînant ainsi le vieillissement de la cellule.

Parmi ces théories, notons celle de l'activation d'un programme après la période de reproduction chez certains animaux et faisant intervenir des hormones ou des facteurs neuronaux (Kirkwood et Cremer, 1982).



### 1.1.2. Théories génétiques et stochastiques

Parmi les nombreuses théories existantes, nous retiendrons ici les théories de la régulation génétique, de l'association des gènes au vieillissement, de la différenciation terminale, de la restriction codonique et de l'instabilité du génome.

#### **Théorie de la régulation génique (Kanungo, 1980).**

Au sein de la cellule, il existe un ensemble unique de gènes qui la caractérisent et assurent son développement. Leur activation et/ou leur répression séquentielle, débutant dès la conception de l'oeuf, détermine la durée du développement et contrôle l'apparition de la période de reproduction.

Selon cette théorie, la capacité de l'organisme à se défendre face à certains facteurs néfastes détermine la durée de la phase de reproduction. Ces facteurs seraient dus à des modifications du métabolisme qui peuvent allumer certains gènes indésirables ou affecter l'activité de gènes essentiels.

#### **Théories de la différenciation terminale et de l'association des gènes au vieillissement (pour une revue, Cutler, 1991a).**

Cutler propose que certains gènes essentiels pour la survie des cellules verraient leur expression se modifier au cours du vieillissement, entraînant une différenciation terminale des cellules. Cependant, cette théorie diffère de la précédente en ce qui concerne les facteurs impliqués dans le processus de dérégulation génique.

En effet, si Kanungo mettait l'accent sur une modification des interactions protéines-ADN marquant le terme de la phase de reproduction, Cutler suggère que la dérégulation proviendrait de certains effets néfastes du métabolisme et notamment du métabolisme de l'oxygène, source de radicaux libres (Cutler, 1985, pour une revue, voir Cutler 1991b).

Bien sûr, il faut tenir compte des mécanismes de défense face à ces radicaux libres. Cet argument est en réalité la base du concept de l'association des gènes au vieillissement. Selon celui-ci, plus la régulation des gènes permet une lutte efficace contre les radicaux libres, plus une espèce sera dotée d'une longévité importante (Cutler, 1982). Un principe identique pourrait exister pour d'autres systèmes de régulation et de défense, comme par exemple la réponse hormonale.

Notons que cette théorie est bien stochastique puisqu'un très grand nombre de "dysrégulations" géniques serait capable de conduire à la destruction du système cellulaire.

### **Théorie de la restriction des codons.**

On sait que le code génétique est dégénéré ou en d'autres mots qu'il existe des redondances au niveau des triplets des codons, plusieurs triplets pouvant signifier le même acide aminé. De plus, on a montré que plusieurs types d'ARN de transfert (ARN<sub>t</sub>) existaient pour chaque acide aminé et donc plusieurs amino acyl-ARN<sub>t</sub> synthétases.

Pour Strehler, une cellule différenciée perdrait la capacité de traduire certains messages qu'elle était capable de traduire antérieurement au cours de son développement. Comme la plupart des protéines s'altèrent avec le temps et qu'elles doivent être renouvelées constamment, si leur synthèse *de novo* devient impossible à cause de la perte de certains ARN<sub>t</sub>, la cellule se trouve alors incapable de remplacer certaines protéines altérées (Strehler, 1977).

Cependant, des instabilités peuvent affecter l'ADN lui-même et provoquer, par exemple, des mutations ou des réarrangements de l'ADN (théorie de l'instabilité du génome, Strehler, 1986).

### **Conclusion.**

L'ensemble de ces théories confère une importance non négligeable à l'environnement cellulaire qui peut causer des dommages au hasard dans l'ADN.

La capacité d'une cellule à faire face à ces différents dommages dépend de la nature générale du génome dans sa structure, son organisation, ses possibilités de réparation et d'expression,...

Si les théories génétiques considèrent le génome comme étant la cible de choix pour toute une série de dommages, il n'en va pas de même pour les théories environnementales qui accusent le milieu extérieur de la cellule d'être seul responsable de la perte de l'homéostasie cellulaire.

Détaillons quelque peu ces théories.

#### **1.2. Théories environnementales**

Les théories environnementales sont toutes stochastiques. Passons en revue les principales d'entre elles.



### 1.2.1. Hypothèse de l'erreur catastrophique (Orgel, 1963)

Orgel suggéra que la cause de la détérioration cellulaire pourrait être une diminution de la précision de la machinerie de synthèse des protéines, résultant de l'apparition d'erreurs au sein de cette machinerie complexe. Il envisageait l'évolution de la situation comme suit : supposons une erreur qui se produise et un acide aminé mal inséré dans une chaîne peptidique. Dans la plupart des cas, cette erreur n'aura aucune répercussion, l'enzyme finira par être éliminée sans causer d'autres dommages. Par contre, si cette erreur est introduite dans des enzymes impliquées dans la lecture de l'information (comme les ARN-polymérases ou les ARN<sub>t</sub>-synthétases), alors l'information sera faussée et les nouvelles protéines synthétisées seront également modifiées. Ces dernières pourront à leur tour fausser le transfert d'information et ainsi de suite.

La théorie prévoit que, si cette erreur n'est pas rapidement corrigée, celle-ci pourra s'amplifier et devenir finalement incontrôlable, provoquant de cette manière une erreur catastrophique qui aboutira au dérèglement total puis à la mort de la cellule.

Des travaux récents utilisant des techniques sensibles confirment effectivement l'existence d'une diminution de la fidélité de traduction (Luce et Bunn, 1989) qui ne suffit cependant pas pour expliquer la mort cellulaire, d'où une nouvelle version de la théorie d'Orgel, que nous détaillons ci-dessous.

### 1.2.2. Théorie généralisée de l'erreur catastrophique (Orgel, 1973)

A la suite des expériences réalisées pour vérifier la théorie de l'erreur catastrophique telle qu'elle était formulée initialement par Orgel, on s'aperçut vite qu'elle était trop limitée et qu'en réalité de nombreuses causes (et non seulement une déficience de la machinerie de synthèse) pouvaient donner naissance à des conséquences en chaîne défavorables à la vie de la cellule.

C'est pourquoi, contrairement à son article de 1963, Orgel ne se prononçait plus, en 1973, de manière exclusive sur des phénomènes déclenchant la dégradation cellulaire. Cette théorie généralisée maintenait cependant le concept d'une propagation en chaîne d'un facteur défavorable à la cellule mais on pouvait imaginer plusieurs raisons pour lesquelles une altération apparaissait : infidélité de la synthèse protéique, mutations dans l'ADN nucléaire et mitochondrial, dommages produits dans la membrane par des réactions de peroxydation initiées par des radicaux libres, ...

On remarque que cette théorie devient tellement générale qu'elle regroupe toute une série d'hypothèses sur l'origine des déficiences cellulaires, elles-mêmes donnant



naissance à autant de théories stochastiques du vieillissement cellulaire qu'elles soient génétiques ou non.

Parmi ces nombreuses théories, citons la plus étudiée qui est celle des radicaux libres (voir Harman, 1956, 1969, 1980, 1987 ; Sohal, 1989 ; Crastes de Paulet, 1990 ; Poot, 1991) qui a connu un vif succès.

Les radicaux libres sont des espèces chimiques contenant un électron non apparié dans une orbitale externe d'un de leurs atomes. Cet électron isolé rend l'atome très réactionnel. La molécule d'oxygène, omniprésente chez les organismes aérobies, possède deux électrons non appariés de même spin.

De ce fait, l'insertion simultanée de deux électrons d'un même doublet dans une molécule d'oxygène est impossible. Cependant, l'oxygène peut accepter un électron à la fois, formant ainsi des intermédiaires radicalaires.

A côté des sources exogènes naturelles de radicaux libres (effet des rayonnements lumineux ou d'autres natures comme les rayons UV ou X) et des sources exogènes artificielles par des xénobiotiques (antinéoplasiques, antibiotiques, fumée de tabac, pesticides, herbicides,...) il existe des sources endogènes naturelles (respiration mitochondriale, détoxification au niveau des cytochromes P450 et b5 de la membrane du réticulum endoplasmique, l'action des oxydases dans les peroxysomes,...). Ces radicaux libres sont très réactionnels et sont capables d'attaquer toute une série de molécules biologiques, notamment celles qui contiennent des groupements insaturés. C'est ainsi qu'ils peuvent attaquer l'ADN et les protéines et provoquer des pontages entre les molécules. Toutefois, les cibles les plus vulnérables semblent être les acides gras polyinsaturés.

Ceux-ci seraient oxydés au niveau de leur double liaison et donneraient naissance notamment à la malonaldéhyde ( $\text{HOC-CH}_2\text{-COH}$ ). On peut aisément imaginer les conséquences multiples que peuvent entraîner ces peroxydations d'acides gras dans les membranes : mitochondries moins fonctionnelles, rupture de la membrane lysosomale avec dégradation cellulaire par les enzymes lysosomales,... mais l'argument le plus probant de l'importance de ces réactions de peroxydations au cours du vieillissement est certainement donné par la présence en quantité croissante de la lipofuscine, résidu non dégradable par la cellule qui s'accumule dans les lysosomes.

Quelles sont les raisons du succès de la théorie des radicaux libres ? La formation continue de ces espèces radicalaires réactionnelles et la présence d'une série d'anti-oxydants non enzymatiques et enzymatiques nécessaires à la survie des cellules constituent des arguments importants pour cette théorie qui est devenue très populaire.

Pour citer d'autres théories stochastiques environnementales, rappelons, d'une part celle des liens intermoléculaires (Z-S Nagy, 1978) qui considère le vieillissement cellulaire comme dépendant de la création de liens covalents ou faibles



entre macromolécules telles que le collagène, ou d'autres protéines, intracellulaires cette fois, entre elles, ou avec l'ADN, avec pour conséquence une augmentation des agrégations et immobilisations moléculaires, une perte de fonctionnalité et une plus grande résistance au catabolisme.

D'autre part, citons aussi la théorie de l'accumulation des déchets métaboliques (Hirsch, 1978 ; 1986 ; Hirsch et al, 1989) qui postule que le fonctionnement cellulaire finit par être diminué par cette accumulation.

Il apparaît donc à travers ces exemples que la théorie généralisée de l'erreur catastrophique accepte toute une gamme de phénomènes néfastes liés aux interactions entre la cellule et son environnement.

### 1.2.3. Conclusion

La théorie de l'erreur ne nous renseigne en rien quant à l'existence d'un mécanisme précis d'altération d'un élément de structure ou d'une fonction cellulaire comme étant la cause du vieillissement des cellules; elle nous dit simplement la conséquence de ces dommages : une augmentation du niveau d'erreurs qui s'auto-amplifie et provoque la mort cellulaire. Comment ce niveau d'erreurs s'amplifie-t-il alors que jusque là, il était stable ? La théorie ne nous permet pas d'y répondre.

Il est évident cependant qu'il doit exister au sein du système cellulaire des processus qui permettent de maintenir la structure et les fonctions cellulaires intactes pendant de longues périodes, vu le nombre impressionnant de possibilités d'augmentation du niveau d'erreurs. Strehler pense qu'une augmentation de longévité des espèces animales n'a pu se faire qu'à la suite d'une évolution compensatoire des systèmes de protection afin de maintenir l'état fonctionnel des cellules et des tissus face aux causes multiples de dommages. C'est ainsi que Chiu et al. (1980) proposent que "les dommages cellulaires surviendront lorsque les mécanismes anti-oxydants de protection seront surpassés dans le cas de stress oxydatifs". En effet, il arrive un moment où les mécanismes de défense ne sont plus capables d'assurer l'entretien de la cellule, point de non retour au delà duquel la cellule s'achemine irrémédiablement vers la mort. Cet état irréversible a été repris sous le concept de **seuil critique d'accumulation d'erreurs**, rejoignant dans sa phase finale la théorie généralisée de l'erreur catastrophique (Remacle et al, 1990 ; Michiels et al, 1990 ; Toussaint et al, 1992).



## 2. Le concept de seuil critique d'accumulation d'erreurs

Le concept de seuil critique d'accumulation d'erreurs met en exergue le lien entre les contraintes génétiques qui déterminent la constitution de toute cellule et la pression de l'environnement qui provoque les erreurs et les modifications de tout constituant cellulaire. Mais toute cellule possède des systèmes de protection et d'élimination des dommages, systèmes programmés par le génome au niveau de leur intensité, de leur induction, et ce, en fonction de l'état de différenciation de la cellule. De nombreuses données expérimentales ont permis d'étayer ce concept. C'est ainsi que l'on a montré qu'une production excessive de radicaux libres menait à la mort cellulaire si elle dépassait le seuil critique de résistance cellulaire.

Il est possible de moduler expérimentalement ce seuil critique d'accumulation d'erreurs. D'une part, si l'on module le potentiel énergétique de la cellule en injectant des mitochondries à l'intérieur du cytoplasme (Corbisier et Remacle, 1988), on constate que si les mitochondries sont couplées (c'est-à-dire si les phosphorylations oxydatives sont bien couplées à la respiration), la présence de mitochondries exogènes n'affecte ni la survie des cellules ni leur division. Tout au contraire, si les mitochondries introduites sont découplées, leur injection entraîne la mort cellulaire. Ces auteurs ont également montré que lors d'une production anormalement élevée de radicaux libres mimant celle qui a lieu dans des conditions pathologiques comme l'inflammation d'un tissu, l'ischémie-reperfusion dans diverses situations, l'exposition à des conditions néfastes (ozone, rayonnement U.V., hyperoxie,...) un seuil critique de résistance des mitochondries peut être atteint, conduisant ainsi à des dommages irréversibles (Corbisier et al., 1990). D'autre part, la production excessive de radicaux libres mène à la mort cellulaire. Cette même mort peut être retardée ou annulée par l'injection d'enzymes anti-oxydantes à l'intérieur de la cellule (Raes et al., 1987; Michiels et al., 1990). Dans ces expériences, le seuil critique d'accumulation d'erreurs dû aux radicaux libres est atteint plus difficilement si l'on augmente le contenu intracellulaire en ces enzymes ou au contraire, il peut être plus facilement outrepassé si l'on inhibe les enzymes par des inhibiteurs spécifiques (Michiels et Remacle, 1988) ou par des anticorps (Michiels et al., 1988).

En conclusion, ce concept se propose de réunir les aspects déterministes et stochastiques du vieillissement autour de l'idée que le génome détermine le niveau de défense face aux agents stochastiques d'altération de la structure et du fonctionnement cellulaire.

Néanmoins, si ce concept est capable d'expliquer la mort cellulaire comme une mort survenant des suites d'une augmentation brutale du niveau des erreurs lors de

stress intenses de natures diverses, la question est de savoir ce qui se passe pendant le vieillissement pour finalement aboutir au seuil critique et par là, à la mort.

Enfin, la mort cellulaire ne serait peut être pas une condition nécessaire au vieillissement d'un organe puisque l'observation d'une diminution du nombre de cellules dans un organe au cours du temps est loin d'être générale (Kohn,1982). Dans cette optique, une modification dégénérative du fonctionnement cellulaire serait peut-être une condition suffisante pour expliquer la difficulté croissante de maintenir l'homéostasie, difficulté observée pour la plupart des organes et de leurs fonctions physiologiques.

On peut dès lors se poser la question de savoir comment une cellule finit par connaître une augmentation de son niveau d'erreurs concomitante à une perte d'efficacité de ses fonctions. Comme le suggère Sthreler (1986), la question peut être approchée en utilisant la thermodynamique des systèmes ouverts qui permet une approche globale de l'évolution du système cellulaire au cours du temps. Nous avons réalisé cette approche dans notre laboratoire; détaillons-la quelque peu dans la suite du texte.



### 3. Thermodynamique et vieillissement (Toussaint et al., 1991)

Nous allons présenter une vision du vieillissement qui se base sur un modèle théorique utilisant les fondements de la thermodynamique des systèmes irréversibles tels que développés par l'école de Prigogine.

Au cours des lignes qui suivront, nous présenterons les résultats expérimentaux qui appuient cette théorie.

Mais développons avant tout la théorie des systèmes ouverts.

#### 3.1. Applicabilité de la thermodynamique aux systèmes irréversibles

La cellule peut être considérée comme un système ouvert qui est géré par des échanges de matière et d'énergie. A l'inverse, les systèmes isolés, n'échangent ni énergie, ni matière avec leur environnement et les systèmes fermés n'échangent que de l'énergie avec le monde extérieur.

La cellule étant donc un système ouvert par excellence, nous ne nous intéresserons qu'aux aspects de la thermodynamique en relation avec les systèmes ouverts.

La thermodynamique des processus irréversibles est subdivisée en deux domaines : d'une part, le domaine proche de l'équilibre décrit par des lois linéaires et d'autre part, le domaine loin de l'équilibre décrit par des lois non linéaires.

#### 3.2. Systèmes ouverts proches de l'équilibre

Le premier niveau de complexité de la thermodynamique des systèmes ouverts est constitué des systèmes ouverts proches de l'équilibre décrits par des lois linéaires. En effet, si on se situe près de l'équilibre, il existe une proportionnalité entre les forces  $X_i$  (gradients de température, de potentiel chimique ou de concentrations en métabolites) qui s'appliquent sur le système et les flux  $J_i$  (vitesses d'échange d'énergie et de matière) qui en découlent. Les données expérimentales suggèrent que pour certains processus, le domaine de linéarité est très large alors que pour d'autres phénomènes comme les réactions chimiques, ce domaine se restreint à une zone très étroite proche de l'équilibre.

Les systèmes ouverts, contrairement aux systèmes fermés qui évoluent vers un équilibre, fonctionnent en phase stationnaire, c'est-à-dire qu'au niveau macroscopique les transformations se déroulent à vitesse constante.

Un des concepts les plus importants pour caractériser la phase stationnaire est le théorème de Prigogine (1977) qui démontre que dans un état stationnaire et les paramètres extérieurs ne se modifiant pas, la vitesse de production d'entropie est

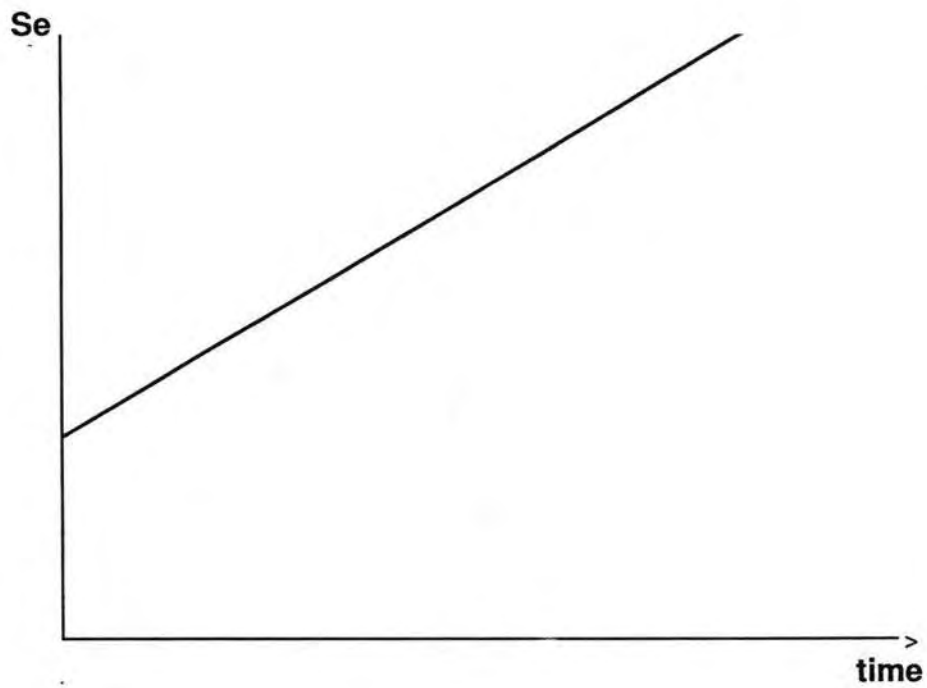


Figure 1.1. Evolution de l'entropie totale reçue par le monde extérieur à un système ouvert à l'état stationnaire dans le domaine linéaire. La production d'entropie est constante et est totalement exportée vers l'extérieur du système entraînant donc une augmentation linéaire de l'entropie de l'environnement (notée ici  $Se$ ).



constante et reste à une valeur minimale. C'est de cette production d'entropie aux dépends de l'environnement que des systèmes ouverts maintiennent leur organisation et, dans le cas des cellules, leur survie. Puisque ce système fonctionne à un minimum de production d'entropie, cela signifie que lorsqu'il est déplacé de cet état stationnaire, sa production d'entropie sera momentanément plus élevée. Mais il va évoluer de telle sorte que sa production revienne à un minimum (Prigogine, 1946). Le développement de la thermodynamique des systèmes ouverts a été rendu possible en considérant des éléments de volume extrêmement petits du système et l'on peut alors considérer chaque élément comme étant soumis à des forces et des flux résultants. Mais tous les éléments de volume du système total peuvent être soumis à des perturbations. Dans ce cas, on peut démontrer que pour un élément de volume, la production d'entropie ( $\sigma$ ) est  $\sigma = \sum J_i X_i$ . On peut alors intégrer cette production d'entropie totale produite à l'intérieur du système ( $\partial S/\partial t$ ).

Cette production d'entropie peut être considérée comme résultant de l'entropie totale produite à l'intérieur du système ( $\partial iS/\partial t$ ) par les processus irréversibles dûs par exemple aux variations des réactions chimiques ou des gradients et aux flux d'entropie ( $\partial eS/\partial t$ ) produits par les flux de chaleur, les flux de diffusion ou par les espèces chimiques diverses quittant le système vers son environnement. Le terme  $\partial iS/\partial t$  est également désigné comme la production d'entropie du système.

Si l'on considère le système dans son état stationnaire, alors son entropie ne varie pas avec le temps et donc  $\partial S/\partial t = 0$ . Dans ce cas,  $-\partial eS/\partial t = \partial iS/\partial t$ , c'est à dire que toute l'entropie produite dans le système sera exportée vers l'extérieur (fig 1.1.). Le théorème de Prigogine implique aussi que toute augmentation de la production d'entropie du système est compensée par un flux d'entropie vers l'environnement externe au système. Du point de vue thermodynamique, la production d'entropie après avoir augmenté du fait des perturbations va ensuite diminuer ( $\partial P/\partial t = 0$ ) jusqu'à atteindre une valeur minimale ( $P_0$ ) caractéristique de l'état stationnaire (fig 1.2.).

En résumé, dans son état stationnaire, le système ouvert proche de l'équilibre va fonctionner à un minimum de production d'entropie qu'il retrouvera après chaque fluctuation et sera stable aussi longtemps qu'il ne dévie pas au-delà de ce domaine linéaire proche de l'équilibre.

### 3.3. Systèmes ouverts loin de l'équilibre

Lorsque les systèmes ouverts sont loin de l'équilibre, les relations qui lient les forces et les flux qui en résultent ne sont plus linéaires ; dès lors, on dira que le système est non linéaire. Dans ces conditions, le théorème de Prigogine n'est plus

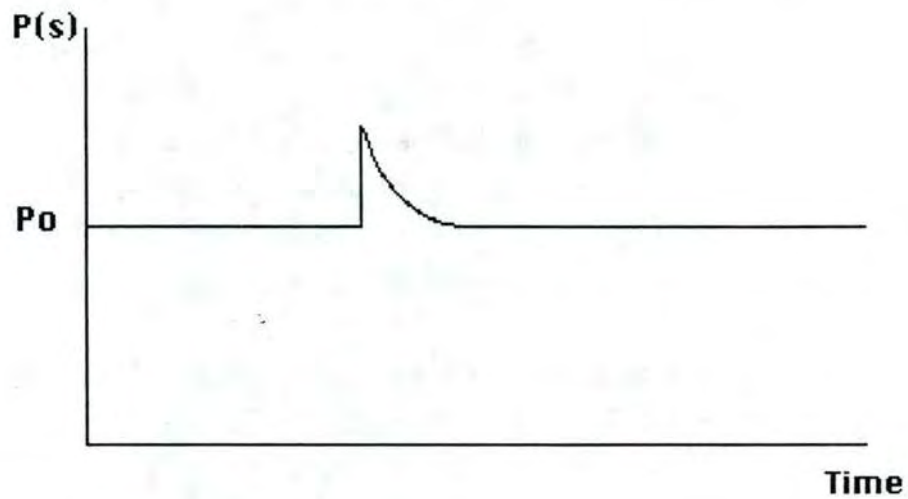


Figure 1.2. Représentation du théorème de Prigogine affirmant qu'un système ouvert linéaire éloigné de son état stationnaire se comporte de manière à ce que sa production d'entropie  $P(s) = \delta_i S / \delta t$  diminue au cours du temps pour revenir à la valeur initiale de production d'entropie  $P_0$ .



valable. C'est le cas des systèmes biologiques à tous les niveaux de fonctionnement depuis les cellules jusqu'aux organismes.

Contrairement aux systèmes linéaires, les systèmes loin de l'équilibre n'ont pas qu'une seule solution face aux fluctuations. En effet, il n'existe pas de mécanisme qui pourrait garantir l'élimination des fluctuations. En effet, celles-ci peuvent être amplifiées et amener une modification importante de l'évolution du système. En réalité, contrairement aux systèmes linéaires qui ne subsistent que dans un et un seul état stationnaire qu'il retrouvait après chaque fluctuation, les systèmes non linéaires peuvent en avoir plus d'un, chacun d'entre eux étant caractérisé par une production d'entropie  $P = \partial S/\partial t$ .

Si ces systèmes ne sont pas stables, cela signifie que lorsqu'ils sont perturbés, ils ne vont pas forcément s'adapter par de petites modifications temporaires de leurs paramètres thermodynamiques.

Au contraire, les fluctuations ouvrent de nouvelles perspectives pour la dissipation de l'énergie qui peuvent conduire le système à changer d'état stationnaire. Comme ces systèmes existent, certains de ces nouveaux états doivent être suffisamment stables que pour pouvoir être observés.

L'établissement des critères de stabilité des systèmes ouverts loin de l'équilibre après une fluctuation peut être étudié tout d'abord si l'on considère le voisinage proche de l'état stationnaire de départ, caractérisé par une entropie  $S^0$  et une production d'entropie  $P^0$ .

Toute fluctuation d'une ou de plusieurs forces  $\partial X_i$  ou de flux  $\partial J_i$  décrivant le système peut prendre de nombreuses valeurs qui dépendent du temps. Si nous explorons seulement le voisinage immédiat de l'état stationnaire, on peut étendre ces deux variables en suite de Taylor, ce qui donne :

$$S = S^0 + \partial S + (1/2) \partial^2 S + \dots \text{ et}$$

$$P = P^0 + \partial P + (1/2) \partial^2 P + \dots$$

L'analyse de ce développement montre que les termes  $\partial S$  et  $\partial P$  ne révèlent aucune propriété remarquable qui puisse être reliée à la stabilité des états stationnaires de départ ( $S^0$  et  $P^0$ ). Par contre, ce sont les termes de second ordre :  $(1/2) \partial^2 S$  et  $(1/2) \partial^2 P$  qui nous fournissent certaines informations. En réalité, il a été démontré (Glansdorff et Prigogine, 1971) que  $(1/2) \partial^2 P$  est relié à la partie de la production d'entropie générée à partir des fluctuations encourues par le système. Il s'agit donc de l'excès de production d'entropie dû à ces fluctuations ; on le désigne sous le terme  $\partial xP$ .

Ce terme est lié aux variations des forces et des flux occasionnées lors d'une perturbation à l'intérieur de tout élément de volume de la manière suivante :



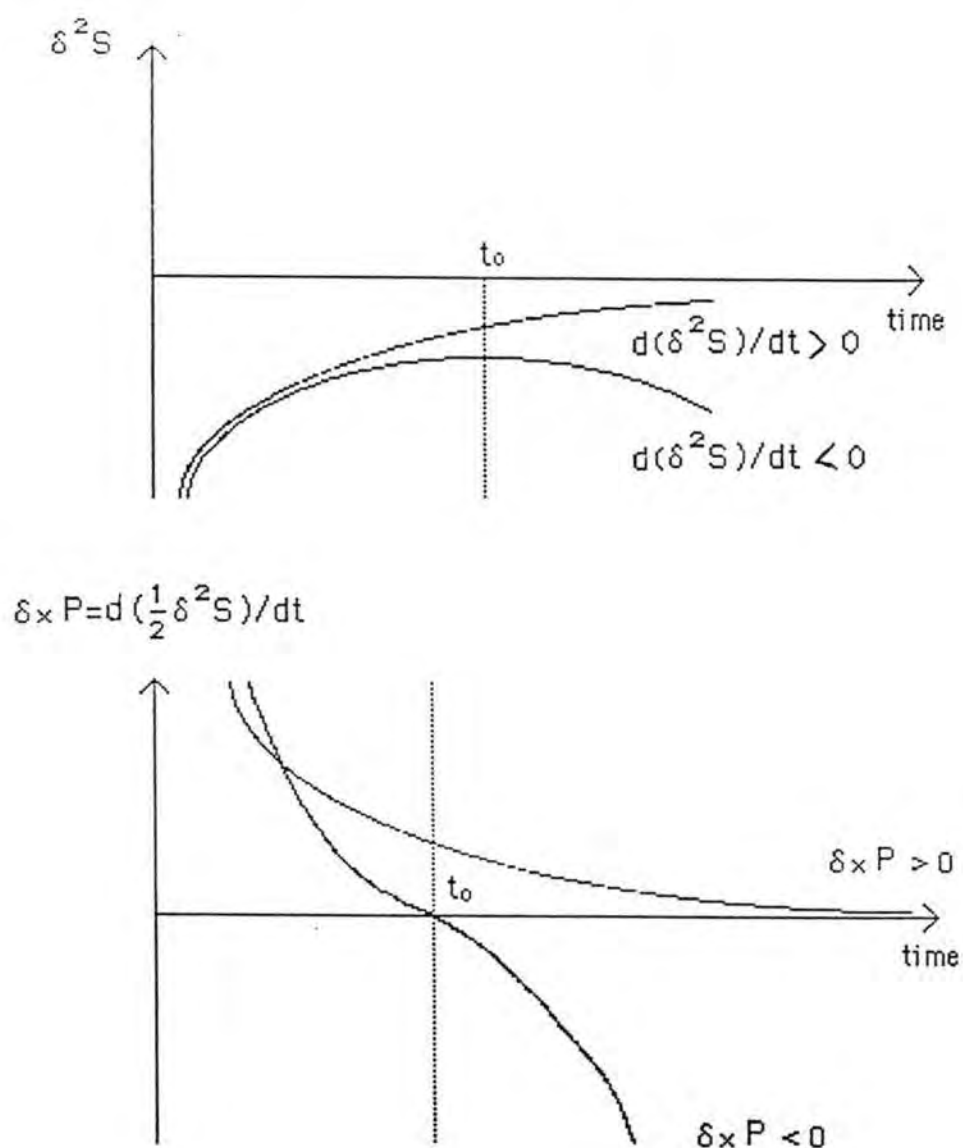


Figure I.3. Critère de stabilité pour les états stationnaires loins de l'équilibre. Des fluctuations causent une augmentation de  $d^2 S$  (qui devient plus négatif). Si le système peut supprimer ces fluctuations, alors  $d^2 S$  devient moins négatif, autrement dit,  $d(d^2 S)/dt$  est positif. Dans ce cas, le système est stable ( $d^2 P = d(d^2 S/2)/dt > 0$ ). Si le système est incapable de diminuer les fluctuations, alors  $d(d^2 S)/dt$  devient de plus en plus négatif. Dans ce cas, le système est instable ( $d^2 P = d(d^2 S/2)/dt < 0$ ) et cherche un nouvel état stationnaire.

$$\partial xP = (1/2) \partial^2 P = \int dv \sum_i \partial J_i \partial X_i$$

Ceci représente l'intégration sur tout le volume du système des variations des forces responsables de l'existence du système et des flux résultants présents dans chaque élément du volume du système et dus aux perturbations.

Pour un système dans l'état d'équilibre, le critère de stabilité est  $\partial^2 S \leq 0$ . Si on accepte qu'au niveau de chaque élément de volume du système, il existe un équilibre local (Coveney, 1988; Babloyantz, 1986), alors cette condition peut être appliquée à chaque élément de volume et par la suite intégré pour l'ensemble du système :

$$1/2 \partial^2 S = 1/2 \int dv \partial^2 s \leq 0$$

où  $\partial s$  est la production locale d'entropie. Le second terme de cette équation est directement lié à la production d'entropie en fonction du temps telle que :

$$\partial xP = (1/2) \partial^2 P = \partial (1/2 \partial^2 S) / dt$$

Nous possédons ainsi un critère d'évolution du système après fluctuation. En effet, le système sera stable, c'est-à-dire reviendra à son état stationnaire de départ ( $S^0$ ) si le terme  $\partial^2 S$  est  $\leq 0$ .

Dans le cas contraire, si  $\partial^2 S$  augmente, c'est à dire qu'il devient moins négatif,  $\partial xP$  sera  $< 0$ . Dans ce cas, le système ne reviendra pas à son état stationnaire de départ, il sera donc instable (fig 1.3.).

En conclusion, nous dirons donc que c'est le signe de l'excès de production d'entropie qui donne l'information sur la stabilité de l'état stationnaire. S'il est positif, le système revient à son état stationnaire de référence; s'il est négatif, il quitte cet état. En termes plus concrets, un système ouvert loin de l'équilibre quittera son état stationnaire, si une perturbation ou une modification initiale quelconque s'amplifie jusqu'à une valeur critique. C'est alors que le système cherchera un nouvel état stationnaire ou disparaîtra.

### 3.4. Evolution des systèmes ouverts en fonction du temps

Dans le cas des systèmes linéaires, le théorème de Prigogine permet de prédire l'évolution du système ouvert en fonction du temps puisque celui-ci évolue de manière à reprendre une valeur minimale de production d'entropie à l'état stationnaire, c'est-à-dire  $\partial P/dt = 0$ . Autrement dit, lorsque le système est entraîné hors de son état

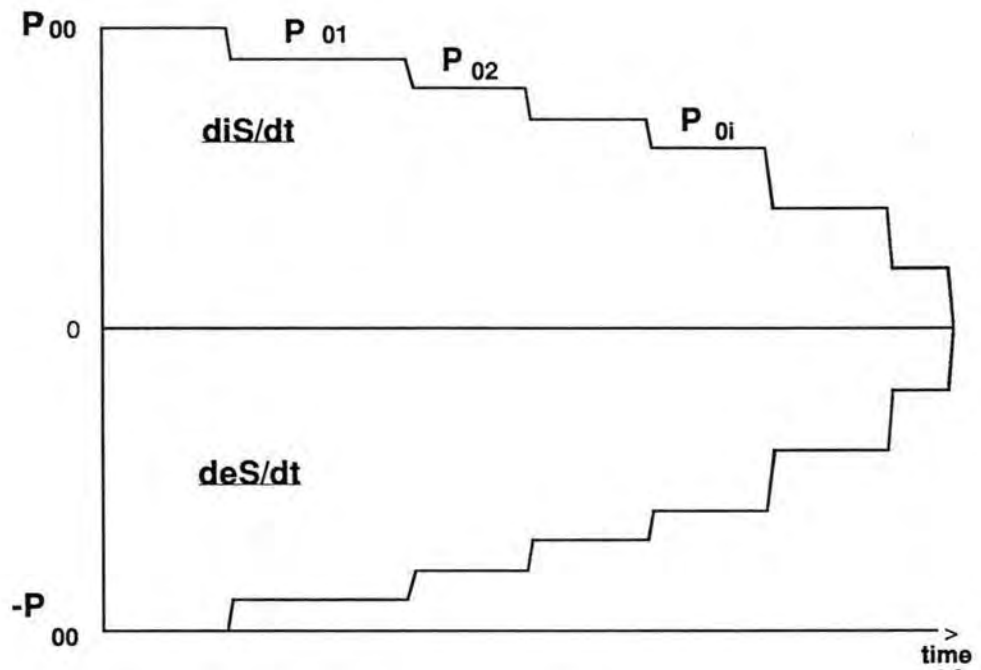


Figure 1.4. Evolution de la production d'entropie interne en fonction du temps. Le niveau de la production d'entropie va augmenter graduellement en fonction du temps donnant lieu à des états stationnaires successifs. Dans de tels états, l'entropie produite sera totalement exportée puisque  $-d_e S = d_i S$ . Cependant, à chaque saut de production d'entropie d'un état stationnaire à l'autre, cette égalité est rompue jusqu'à ce qu'un nouvel état stationnaire soit atteint.



stationnaire, la variation de la production d'entropie va diminuer au cours du temps jusqu'à s'annuler : le critère d'évolution sera donc  $\partial P/\partial t = 0$ .

Dans le domaine non linéaire, l'interdépendance des forces et des flux est complexe et difficile à évaluer. Dans ce cas, la variation de la production d'entropie en fonction du temps sera toujours fonction de la variation des forces  $\partial X_i$  et des flux  $\partial J_i$  qui sont maintenant dépendants les uns des autres. On peut donc considérer les variations dans la production d'entropie au cours du temps comme provenant de la vitesse de changement des forces considérant les flux constants ( $\partial xP/\partial t$ ) plus la contribution due aux changements des flux considérant les forces constantes ( $\partial jP/\partial t$ ). En ce qui concerne la stabilité du système, seul le terme  $\partial xP/\partial t$  est essentiel et peut être examiné en analogie au terme  $\partial P/\partial t = 0$  défini dans le domaine linéaire (Babloyantz, 1986). Ce terme est négatif lorsque le système est entraîné en dehors de son état stationnaire.

L'application d'un tel concept à un système comme une cellule est difficile puisqu'il n'est pas possible d'isoler la part de production d'entropie produite par les forces seules de celle produite par les flux. On est donc obligé de considérer le problème d'un point de vue qualitatif.

Une cellule peut être considérée à un moment donné comme étant un état stationnaire où l'entropie produite à l'intérieur du système est constamment égale à l'entropie reçue par l'extérieur du système, soit :  $-\partial_e S/\partial t = \partial_i S/\partial t$ .

Cependant, si l'on suit le système au cours du temps, cela n'est plus vrai. En effet, si toute l'entropie produite dans la cellule était exportée totalement à l'extérieur, la cellule serait éternelle ce qui n'est pas le cas des cellules normales. Ce que l'on observe au contraire dans les systèmes ouverts et dans les cellules au cours de leur vie, c'est une diminution progressive de la production d'entropie corrélée avec une diminution au cours du temps de l'entropie qui est exportée à l'extérieur du système (fig 1.4.).

Rappelons que l'entropie produite dans un système ouvert, tel qu'une cellule en phase stationnaire, représente la différence entre l'entropie des molécules qui entrent dans le système et les flux qui le quittent. On comprend alors que cette production d'entropie est directement liée à la quantité d'énergie libre totale disponible dans la cellule du fait de ces transformations chimiques ou de flux, cette énergie libre disponible étant finalement transformée après utilisation par la cellule en entropie. Que représente donc la diminution de la production d'entropie interne d'une cellule?

Cette diminution peut être liée à une diminution de la capacité qu'a la cellule de transformer l'énergie en travail avec le temps. Cette affirmation générale comporte deux aspects : d'une part, elle signifie que pour une quantité donnée de molécules énergétiques pénétrant dans la cellule, leur transformation en travail, en nouvelles molécules synthétisées ou en énergie libre diverse, est diminuée. En d'autres mots, le

AUTEURS	Tranche d'âge (Années)				
	40-49	50-59	60-69	70-79	80-89
Boothy et al.	37,65	36,34	36,52	-	-
Robertson and Reid	35,20	34,30	32,30	32,70	-
Du Bois	38,50	37,50	36,50	35,50	-
Shock and Yienst	35,75	34,50	33,00	32,60	30,05
Kountz et al.	35,18	34,41	34,14	31,26	30,31
Benedict	-	-	-	31,00	31,30
Aub and Dubois	-	-	-	35,10	-
Matson and Hitchcock	-	-	-	31,20	29,30
Binet et al.	-	-	-	31,08	29,44
Binet and Bourliere	-	-	-	32,80	30,47
Binet and Bourliere	-	-	-	34,90	30,80
Aaltonen	-	-	-	-	32,70
Kise and Ochi	-	36,05	34,90	33,16	32,06
Valeurs moyennes	36,24	35,51	34,56	32,84	30,70

(Pour les références précises, voir Zotin et Zotina, 1978)

Tableau 1.1. Le métabolisme basal chez l'homme ( $\text{Kcal.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ ).

Tissus ou organes	Diminution de l'intensité de la respiration (%)
Cerveau	18,0
Rein	19,0
Rate	24,2
Foie	29,6
Testicules	42,8
Muscles	60,0
Intestin	65,0
Cartilage	74,6
Peau	85,2
valeur moyenne	46,2

Tableau 1.2. Diminution de l'intensité de la respiration (%) dans des tissus et des organes de rats âgés par rapport à ceux de jeunes rats (modifié d'après Nagorny *et al.*, 1963).



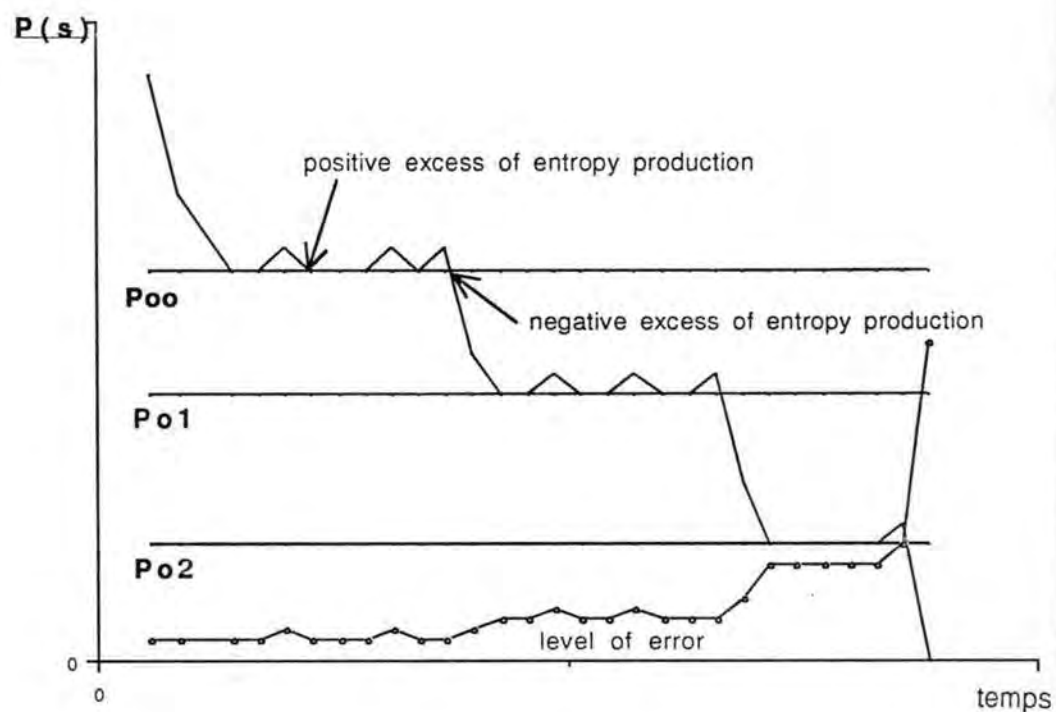


Figure 1.5. Evolution de la production d'entropie  $P(s)=d_iS/dt$  en fonction du temps dans un système ouvert loin de l'équilibre. Les différents niveaux de  $P_0$  représentent les différents états stationnaires qui peuvent exister après un excès négatif de production d'entropie. En même temps, le niveau des erreurs à l'intérieur du système va augmenter, cela conduisant finalement à une déstabilisation totale et irréversible du système.

fonctionnement général de la cellule est moins efficace du fait d'altérations diverses dans le fonctionnement de la cellule comme l'augmentation d'erreurs dans les protéines synthétisées, l'accumulation de déchets, un découplage partiel des mitochondries et finalement la modification de certaines relations structurelles. Cette situation a été décrite dans les théories des erreurs .

D'autre part, la diminution de la production d'entropie peut aussi résulter d'une baisse générale de la production d'énergie libre par la cellule. La diminution de la fonction dissipative est directement liée à l'intensité de production de chaleur. Or, on sait très bien que le vieillissement est associé à la baisse de la production de chaleur et à la respiration. De telles constatations ont été réalisées sur des tissus d'insectes, d'amphibiens, d'oiseaux et de mammifères dont les humains (Tableau I.1.)(Mc Gandy et al., 1966 ; Zotin et al., 1978).

Au niveau des organes, l'intensité de la respiration diminue dans la plupart des organes et tissus de rat âgé (Tableau I.2)(Nagorny et al., 1963). D'autres exemples viennent d'expériences réalisées sur des tranches ou des homogénats de tissus et qui sont reprises dans la revue de Hayflick et Finch (1977). De même au niveau cellulaire, on a constaté que le métabolisme diminuait avec le temps, plus spécialement dans les cellules les plus actives métaboliquement comme les hépatocytes ou les cellules musculaires. Dans cette seconde interprétation, les systèmes biologiques vont montrer une diminution générale de leur fonctionnement et de leur métabolisme, résultant de perturbations venant de l'environnement cellulaire ou d'une dérégulation générale du métabolisme contrôlé génétiquement.

### 3.5. Implication de la thermodynamique pour le vieillissement cellulaire

Comment les concepts développés ci-dessus peuvent-ils nous aider à comprendre le processus de vieillissement cellulaire étant donné que le vieillissement est un phénomène complexe variant d'un type cellulaire à l'autre principalement suivant son état de différenciation et son espèce d'origine?

Il existe cependant pour toute cellule, un caractère commun du vieillissement : l'existence de processus irréversibles dépendant du temps et conduisant graduellement à la mort cellulaire. La thermodynamique nous a appris que si la cellule considérée comme un système loin de l'équilibre fonctionnait à un minimum de production d'entropie, il existait d'autres minima possibles et donc, au cours du processus de vieillissement, la cellule pouvait passer de l'un à l'autre (fig I.5.). Nous ne savons pas à ce stade quels pourraient être les facteurs qui influencent ce passage. Nous allons décrire ces facteurs par la suite.



Il nous faut tout d'abord introduire l'importance dans ce processus, des systèmes de défense, de protection et de réparation qui préviennent l'accumulation des erreurs, évitant ainsi une diminution précoce de la production d'entropie. Si ces systèmes n'existaient pas, l'augmentation d'erreurs internes serait très rapide conduisant à une diminution rapide de la production d'entropie. Cette réduction serait tellement rapide que la cellule ne pourrait plus maintenir son métabolisme de base et elle mourrait beaucoup plus rapidement que ce n'est le cas dans la réalité. En conclusion, l'évolution de la cellule vers des états de production d'entropie plus faibles doit certainement tenir compte du rôle de défense joué par les multiples systèmes qui protègent la cellule contre les divers stress.

### 3.5.1. Effet des stress stochastiques

Afin de mieux comprendre l'impact des stress sur l'évolution possible des cellules, ils ont été répartis en trois groupes suivant leur importance relative.

Il y a d'abord, ce que nous appellerons les "petits stress" qui sont omniprésents tels que les petites fluctuations de pH, de température, de composition ionique ou la présence de radicaux libres, de produits chimiques, d'excès ou de pénurie de nutriments, de dommages au niveau de l'ADN...

En termes thermodynamiques, ces stress de faible intensité correspondraient à de faibles variations d'une ou de plusieurs forces ( $\partial \Delta X_i / dt \neq 0$ ) conduisant à une augmentation légère des erreurs qui sont alors corrigées immédiatement par la cellule grâce à ses systèmes de défense ou à une adaptation (induction, par exemple), pour compenser l'effet des variations externes. La cellule a ainsi divers modes de réaction différents devant ces stress. Lorsque le système cellulaire utilise ses systèmes de défense et de réparation pour corriger ou éliminer les erreurs, il va exporter la chaleur et les produits de ces réactions en dehors de la cellule. Cette correction nécessite une utilisation d'énergie libre qui va donc augmenter temporairement la production d'entropie libre (Zotin et Zotina, 1978). Le retour à l'état antérieur de production d'entropie, s'il est possible, représente en fait, une variation positive de la production d'entropie ( $\partial xP = \partial [(1/2) \partial^2 S] / dt > 0$ ). Ce qui signifie le maintien de la stabilité. En fait, lorsque les erreurs seront corrigées, en d'autres mots lorsque les fluctuations initiales disparaîtront, la production d'entropie reviendra au niveau correspondant à l'état stationnaire.

Même si quelques erreurs irréversibles se sont produites suite au stress, le système cellulaire pourra se comporter de telle manière que les autres fonctions pourront contre-balancer ces erreurs irréversibles. Ainsi la thermodynamique prévoit que même si les variations globales des forces résultant de la fluctuation sont nulles ( $\partial \sum \partial X_i / dt = 0$ ) lorsque le système revient à son état stationnaire, certaines



forces  $\Xi$  peuvent être plus basses alors que d'autres peuvent avoir augmenté. En termes de biologie cellulaire, cette variation dans les  $\Xi$  peut être traduite en termes de modification de l'expression de certains gènes et de leur régulation. Cette situation correspond ainsi à une deuxième réaction possible de la cellule face au stress, c'est-à-dire une induction temporaire ou définitive de certaines protéines ou enzymes modifiant temporairement ou définitivement l'ensemble du fonctionnement cellulaire. Dans tous les cas cependant, le système reviendra à un état stationnaire de production global d'entropie identique à celui de départ.

Le second groupe de stress correspondrait à des stress répétés sur une courte période de temps ou à des stress intenses résultant de situations tout à fait anormales pour les cellules, telles que dans certaines conditions pathologiques comme des processus inflammatoires dans un tissu, les phénomènes d'ischémie-reperfusion, l'alcoolisme chronique pour le foie, les rayonnements U.V. ou X..., les produits toxiques,... Dans ces situations, il n'y aura pas seulement une faible augmentation de la production d'entropie mais les systèmes de défense spécifiques de la cellule seront dépassés et pourront même être altérés. De nombreuses erreurs ou modifications apparaîtront ainsi à divers niveaux de l'organisation de la cellule et d'autres systèmes de défense devront à leur tour être mis en oeuvre pour protéger la cellule.

Alors que dans le cas d'un stress isolé et faible, les molécules ou les conditions stressantes n'ont pas la possibilité de causer un nombre élevé d'erreurs irréversibles, lors d'un stress important, ou lors de stress répétés, le nombre d'erreurs produites est si élevé que les systèmes de défense spécifiques du type de stress qui a lieu ne seront plus suffisants pour enrayer le processus d'altération de la cellule. D'autres moyens de défense sont alors requis. Si ces systèmes, qu'ils soient induits ou non par le stress, sont capables de corriger les erreurs, alors la cellule reste stable et il y aura seulement un excès positif de production d'entropie comme dans le cas de stress faibles omniprésents.

Par contre, si ces systèmes de défense ne corrigent pas assez rapidement cette quantité importante d'erreurs, d'autres constituants structuraux de la cellule pourront être touchés, de même que certaines fonctions régulatrices. Le comportement de la cellule face à de tels stress dépend fortement de l'intensité et de la vitesse de réparation face à l'intensité du stress. Premièrement, l'intensité des systèmes de défense doit être suffisante pour permettre une correction des erreurs avant qu'elles ne soient transmises à d'autres composants du système cellulaire. Deuxièmement, la cinétique de réparation doit être suffisante. Par exemple, l'induction enzymatique est souvent nécessaire à une réaction efficace face aux stress. Cette induction enzymatique nécessite non seulement une importante quantité d'énergie mais aussi un certain temps avant d'être opérationnelle. Pendant la période d'induction, les erreurs générées par les stress les plus divers peuvent s'étendre de leur point d'origine vers les autres

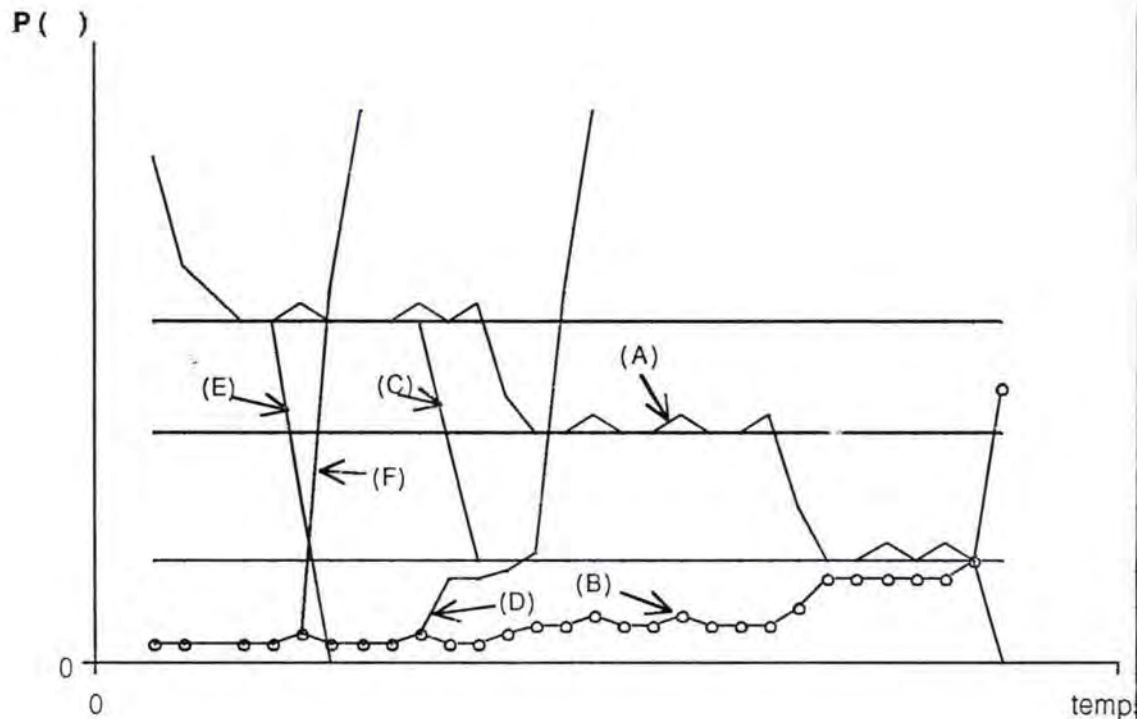


Figure 1.6.

Effet de faibles stress sur la production d'entropie. Le système réagit de manière à revenir à sa production d'entropie initiale (A) et à son niveau d'erreurs initial (B).

Effet de stress plus intenses sur la production d'entropie. Un stress peut déstabiliser le système si bien qu'il chute dans un nouvel état stationnaire caractérisé par une production d'entropie plus faible (C) et un niveau d'erreurs plus élevé que dans la situation initiale (D). La capacité de résister à des stress subséquents sera plus faible et le seuil critique d'accumulation d'erreurs sera plus facilement atteint.

Effet de stress très intenses sur la production d'entropie. Le niveau d'erreurs devient tellement élevé lors du stress que le système ne peut pas trouver de nouvel état stationnaire et finit donc par disparaître (E et F).



constituants cellulaires comme l'ADN ou les mitochondries et ainsi devenir irréversibles, c'est-à-dire entraîner une modification irréversible du fonctionnement global de la cellule qui fonctionnera alors avec une efficacité moindre, c'est-à-dire que sa capacité de transformer ses substrats en énergie libre et en travail sera diminuée, ce qui amène une production globale d'entropie plus basse. Lors d'une telle évolution, les perturbations initiales laisseront une empreinte puisqu'elles conduiront à la production de modifications irréversibles et à une diminution de production d'entropie. Cet excès négatif va déstabiliser la cellule qui devra rechercher un nouvel état stationnaire. Un seul choix s'offre alors à la cellule : soit elle trouve ce nouvel état stationnaire, soit elle ne le trouve pas : elle va dégénérer et mourir. Si elle trouve un nouvel état, celui-ci aura deux caractéristiques différentes de l'état stationnaire initial : une production d'entropie plus faible et un niveau d'entropie interne plus élevé.

Enfin si les stress sont vraiment trop importants, et ceci constitue le troisième type de stress, la cellule sera tellement déstabilisée et les erreurs tellement nombreuses et s'étendant à trop de constituants cellulaires, que la cellule ne pourra plus retrouver un état stationnaire, même à un niveau de production d'entropie qui lui permette d'assurer ses fonctions essentielles et de rester en vie. On atteint directement le seuil critique d'accumulation d'erreurs (il s'agit bien dans ce cas d'une erreur catastrophique telle que décrite par Orgel en 1973).

Comme on le voit, le résultat de l'effet des trois types de stress sera variable suivant l'intensité du stress mais aussi suivant le type cellulaire et son état physiologique. Dans le cas de cellules jeunes dans lesquelles l'énergie libre disponible est importante, aucune différence ne sera perceptible suite à des stress. Cependant, avec l'âge, la résistance au même type de stress pourra s'avérer moins efficace vu la disponibilité énergétique plus faible des cellules vieilles. Ainsi, les cellules vieilles vont passer plus facilement vers des états de production d'entropie plus faibles de telle manière que leur potentiel de défense ainsi que l'induction des systèmes de réparation vont devenir de plus en plus faibles. Finalement, le niveau d'erreurs va être tel que la cellule ne pourra plus maintenir le métabolisme de base nécessaire à sa survie. Ce sera l'étape finale de la cellule puisqu'elle ne pourra plus résister à aucun stress.

La question que l'on peut se poser est la suivante : quel est le niveau d'erreurs qui conduit à la mort cellulaire ? Ce niveau est associé à la capacité de production d'entropie. On a vu qu'il existe une balance entre les conditions d'agressions et les mécanismes de protection, autrement dit entre le niveau d'erreurs intracellulaires et la production d'entropie due aux forces et aux flux qui parcourent la cellule. Lorsque ce système est déstabilisé vers une augmentation du niveau d'erreurs, la cellule ne peut plus survivre (fig 1.6.). L'homéostasie est alors rompue définitivement.



De manière à traiter le problème de l'équilibre entre les systèmes de défense et les attaques, il faut considérer non seulement le niveau des attaques mais aussi celui des systèmes de défense et de maintien de la structure cellulaire. L'existence et l'intensité de ces systèmes étant régulées par le génome, il est donc évident que ce génome est concerné par d'éventuels changements d'état stationnaire du système cellulaire pris dans sa globalité.

### 3.5.2. Influence du génome

L'état de différenciation qui résulte de l'expression génétique conditionne le comportement de la cellule et l'évolution de son vieillissement. Chaque espèce a une durée de vie maximale qui la caractérise. Ceci est vrai aussi au niveau cellulaire. Ainsi les cultures de fibroblastes isolés à partir de tissus embryonnaires de diverses espèces et qui sont maintenus dans des conditions standardisées, c'est-à-dire avec un minimum de stress externes excepté les traitements à la trypsine et une augmentation de la tension en oxygène de l'environnement, ont un nombre maximum de générations spécifique de l'espèce et du tissu d'origine. Selon certains auteurs, le vieillissement cellulaire caractéristique d'une espèce est ainsi considéré comme génétiquement déterminé et serait la continuation du processus de différenciation. Bayreuther et al. (1988, 1989) ont par exemple montré que les fibroblastes humains vieillissant *in vitro* passaient par diverses étapes bien précises de différenciation. Ils ont pu mettre en évidence sept états cellulaires passant tout d'abord par trois stades successifs de cellules mitotiques se divisant de moins en moins rapidement, puis par quatre stades de cellules post-mitotiques dont le dernier correspond à l'état de dégénérescence final. Du point de vue thermodynamique, ces résultats peuvent être interprétés comme l'évolution de la cellule par au moins six états stationnaires différents. Ces états devenant successivement instables, la cellule devrait trouver chaque fois un nouvel état stationnaire, sauf lors de la dernière étape où l'instabilité serait si grande que la cellule dégénérerait et mourrait.

L'interprétation thermodynamique liée à ce processus est que les cellules étant un système ouvert loin de l'équilibre, dès lors, elles doivent ajuster leur comportement de manière à fonctionner à un minimum de production d'entropie. Le nombre possible de minima et donc d'états stationnaires peut être limité étant donné l'état de différenciation de la cellule. Cette interprétation ne contredit pas les théories déterministes mais met en évidence le fait que les cellules peuvent subsister seulement comme un ensemble qui résulte de l'expression du génome mais aussi de l'optimisation des fonctions cellulaires étant donné leurs besoins en énergie. Les raisons du passage "naturel" d'un état à l'autre, autrement dit, sans stress important pourraient être multiples. Comme on l'a mentionné plus haut, un système ouvert loin



de l'équilibre peut très bien rester à un certain état stationnaire et connaître néanmoins certaines modifications. Comment cela pourrait-il se produire ?

Rappelons que si un tel système subit un faible stress mais que ce dernier n'est pas suffisant pour déstabiliser l'état stationnaire, celui-ci reviendra à son état de départ. Cependant même si  $\partial \sum X_i / dt$  revient à zéro, il est possible que certains  $X_i$  soient diminués alors que d'autres  $X_i$  augmentent, leur somme totale restant égale à zéro. Ceci est important si l'on considère le vieillissement comme un phénomène inévitable pour des cellules non soumises à des stress importants. Le passage à un nouvel état stationnaire finira par avoir lieu s'il n'y a plus compensation entre les  $X_i$  qui augmentent et les  $X_i$  qui diminuent.

Biologiquement, ces réajustements peuvent survenir à la suite de déstabilisations de l'ADN. On retrouve alors le postulat de Strehler qui propose que les instabilités de l'ADN sont la source principale du vieillissement (Strehler, 1986). De telles instabilités forceraient la cellule à adopter de nouveaux états stationnaires pour lui permettre de survivre malgré certaines modifications de structure, de fonction ou de régulation.

### 3.6. Conclusion

Il semble donc que les cellules peuvent subsister dans un certain nombre fini d'états stationnaires dans lesquels elles optimisent leur production d'énergie en diminuant le plus possible leur production d'entropie tout en s'opposant au maximum de leurs capacités au passage à l'état stationnaire suivant le plus probable.

Ce modèle permet également de reconsidérer les aspects stochastiques et déterministes du vieillissement cellulaire, tout en démontrant que les interactions entre ces aspects sont multiples. Par exemple, une prévision de ce modèle est que l'on pourrait accélérer la transition entre ces différents états stationnaires lors de stress intenses ou répétés. D'autres prédictions de ce modèle sont que d'autres facteurs peuvent intervenir comme la capacité de réponse du métabolisme de la cellule à un stress et ceci afin de défendre efficacement la cellule ou comme l'intensité des systèmes de protection spécifiques aux stress encourus.

L'aspect théorique du modèle ayant été présenté et les diverses prévisions tirées, ces dernières ont dû être testées expérimentalement. Ces résultats sont brièvement décrits plus bas dans l'introduction. Ils ont été obtenus à partir d'expériences visant à tester premièrement, si des stress importants mais non létaux sont capables d'accélérer le processus de vieillissement des cellules en culture (Toussaint et al., 1992) et deuxièmement, si des molécules énergétiques ou le niveau des défenses face aux stress seraient impliqués dans ce processus. Ces résultats ont été acquis à partir

du modèle de vieillissement *in vitro* des fibroblastes WI-38. Décrivons maintenant ce modèle.



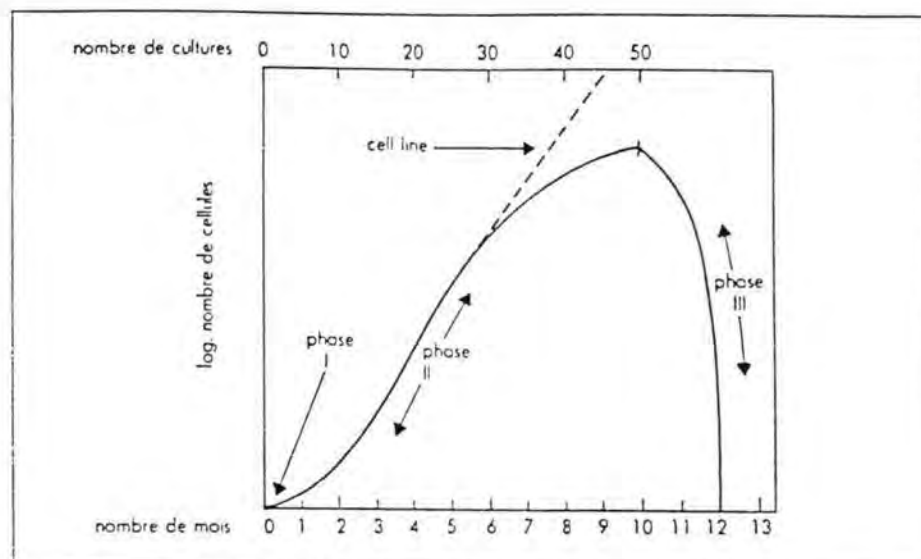


Figure 1.7. Représentation schématique de l'évolution d'une culture cellulaire au cours des subcultures successives. La phase I se termine avec la formation de la première culture confluyente à partir de l'explant. La phase II est caractérisée par une croissance importante nécessitant de nombreux repiquages. Une altération de la croissance donnant lieu à un point d'inflexion de la courbe finit par avoir lieu. La culture entre alors en phase III. Plus tard, les cellules arrêtent de se diviser puis finissent par dégénérer et mourir après un temps fini. Pour des cellules provenant de certaines espèces, les cellules peuvent donner des lignées à potentiel prolifératif infini: "cell line" sur la figure (à partir de Hayflick, 1977).

#### 4. Le modèle expérimental : les fibroblastes WI-38

##### 4.1. Le comportement des fibroblastes embryonnaires en culture

Léonard Hayflick fut le premier à montrer que les cellules humaines en culture avaient une durée de vie limitée (Hayflick et Moorhead, 1961). Ainsi, les fibroblastes dérivés de tissus embryonnaires humains normaux atteignent approximativement cinquante passages *in vitro* avant de perdre tout pouvoir prolifératif.

En réalité, l'évolution des cellules en culture peut se diviser en trois phases (fig 1.7.). La phase I représente la mise en culture de l'explant après digestion enzymatique partielle des échantillons. La phase II est caractérisée par une croissance rapide (exponentielle) et pratiquement constante entre chaque repiquage. Et enfin, la phase III, phase finale, montre un ralentissement de plus en plus marqué du rythme des mitoses. Cette phase de déclin de la capacité de prolifération a été considérée comme étant une manifestation du vieillissement au niveau cellulaire. Hayflick et Moorhead ont également montré que ce phénomène n'était pas la conséquence d'une déficience en l'un des constituant du milieu de culture ou d'un artéfact technique mais bien un phénomène intrinsèque à la cellule. Notons aussi qu'un grand nombre de modifications biochimiques surviennent au cours du processus de vieillissement (Hayflick, 1977) : altération de l'activité de nombreuses enzymes, des fonctions cellulaires, du contenu cellulaire en diverses molécules (ADN, ARN, protéines) ou leur turn-over.

##### 4.2. Existence d'une relation inverse entre l'âge du donneur de cellules et la longévité atteinte en culture

L'observation montre qu'il existe une relation inverse entre l'âge du donneur et le nombre de générations atteint par les fibroblastes en culture. Ceci confirme le concept de l'existence d'une relation inverse entre le vieillissement *in vivo* et le vieillissement *in vitro*. De plus, on constate que la densité de saturation (nombre de cellules à confluence) est significativement plus basse dans des culture de cellules dérivées d'explants de peau de donneurs âgés par rapport à celles provenant de jeunes donneurs (Tableau 1.3 (a)).

Ce déclin de la densité de saturation est un signe typique de la sénescence des cultures des fibroblastes et est un marqueur *in vitro* du vieillissement cellulaire.

Des arguments supplémentaires en faveur de l'existence d'une relation inverse entre le vieillissement *in vivo* et *in vitro* peuvent être déduits de la réduction de la capacité de réplication de fibroblastes provenant d'individus frappés par des syndromes accélérant le vieillissement. Parmi ceux-ci, citons le syndrome de Werner

FETAL LUNG		ADULT LUNG		
Strain	Passage level at which Phase III occurred (population doublings)	Strain	Passage level at which Phase III occurred (population doublings)	Age of Donor
WI-1	51	WI-1000	29	87
WI-3	35	WI-1001	18	80
WI-11	57	WI-1002	21	69
WI-16	44	WI-1003	24	67
WI-18	53	WI-1004	22	61
WI-19	50	WI-1005	16	58
WI-23	55	WI-1006	14	58
WI-24	39	WI-1007	20	26
WI-25	41			
WI-26	50			
WI-27	41			
WI-38	48			
WI-44	63			
	Average 48		20	
	Range 35-63		14-29	

<sup>a</sup>All strains cultivated at a 1:2 split ratio. Fetal strains derived from donors of 3-4 months' gestation obtained by surgical abortion. Adult and fetal strains derived from both male and female tissue.

Syndrome	Age in years	No. of population doublings <i>in vitro</i>	Reference
Progeria	9	2 <sup>a</sup>	Goldstein, Littlefield, and Soeldner, 1969
Werner's Patient 1	48	2	Martin, Sprague, and Epstein, 1970
Werner's Patient 1	49	5	Martin, Sprague, and Epstein, 1970
Werner's Patient 2	48	8	Martin, Sprague, and Epstein, 1970
Werner's Patient 3	37	10	Martin, Sprague, and Epstein, 1970
Werner's Patient 4	43	4.5	Martin, Sprague, and Epstein, 1970
Progeria	5	30	Martin, Sprague, and Epstein, 1970

<sup>a</sup>Same result with two separate skin biopsies.

D'après Hayflick, 1961.

Tableaux I.3 (a,b). Comparaison du nombre de passage atteint en culture pour des lignées diploïdes humaines d'origine adulte et fœtale (a).

Nombre de passages en culture atteints par des fibroblastes provenant de patients atteints du syndrome de Werner et de Progerie (b).

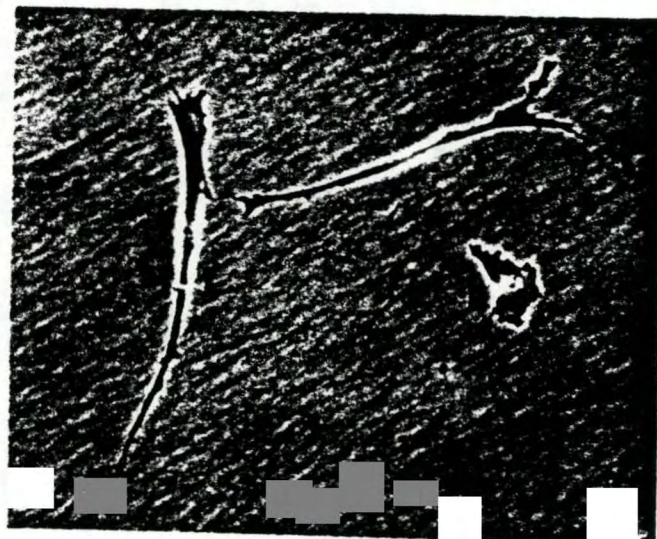
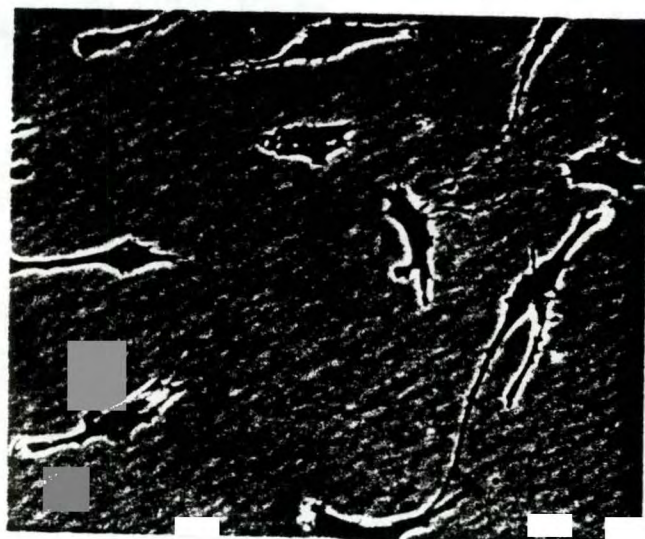
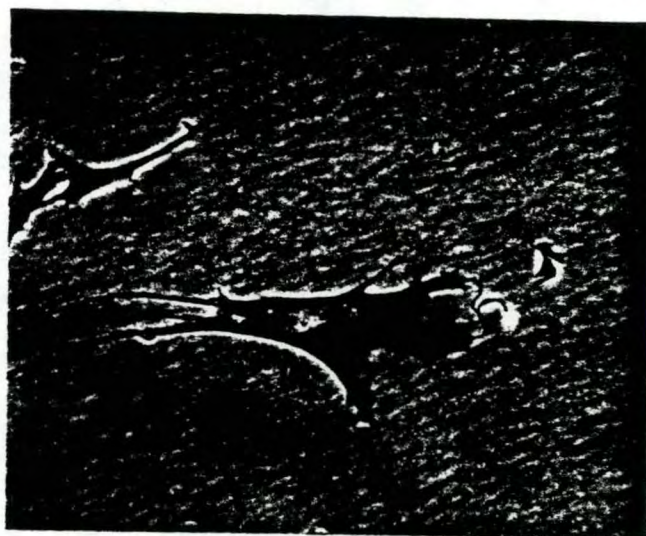
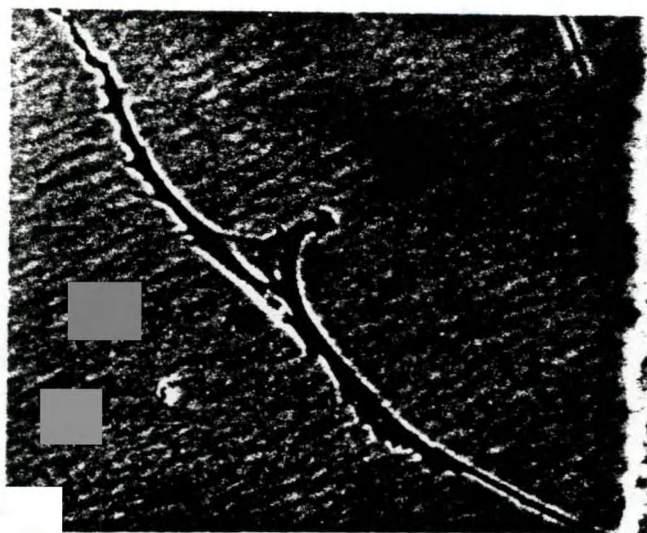
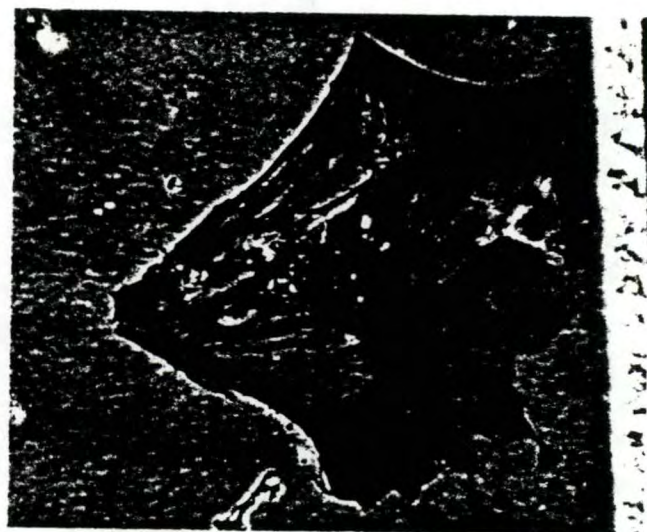
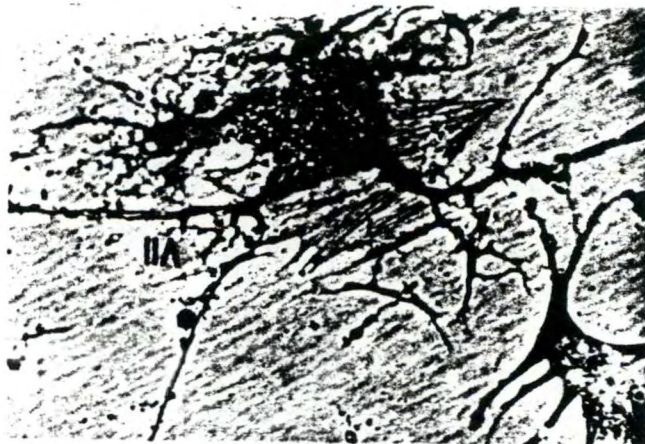




Fig 1.8 (b). Morphotypes mitotiques et post-mitotiques des fibroblastes WI-38.

(1) fibroblastes mitotiques MF I, (2) fibroblastes mitotiques MF II, (3) fibroblastes mitotiques MF III, (4) fibroblastes post-mitotiques PMF IV, (5) fibroblastes post-mitotiques PMF V, (6) fibroblastes post-mitotiques PMF VI, (7) fibroblastes post-mitotiques en dégénérescence PMF VII. (grossissement 180x)







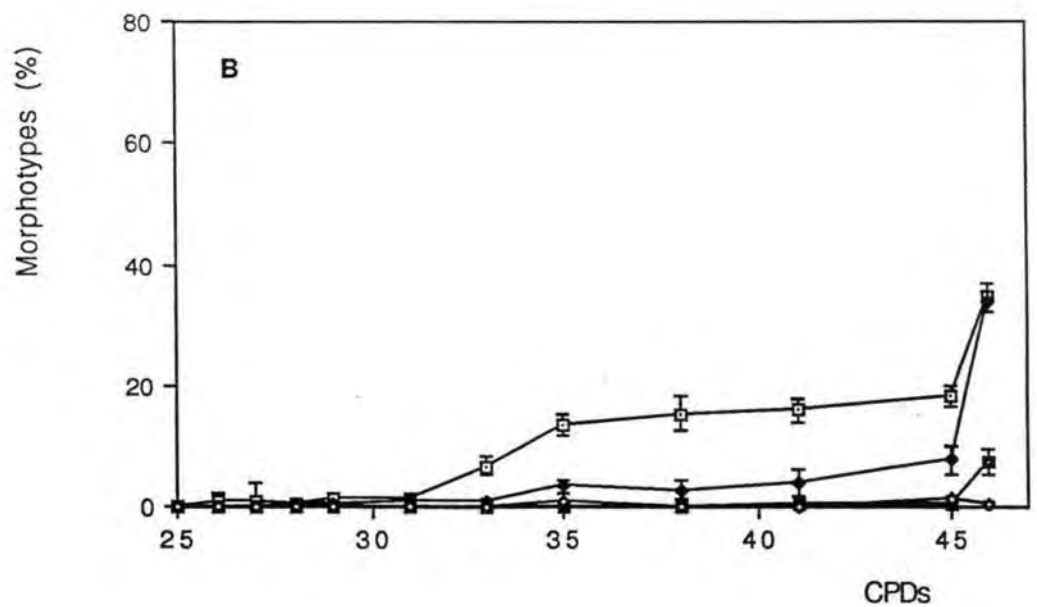
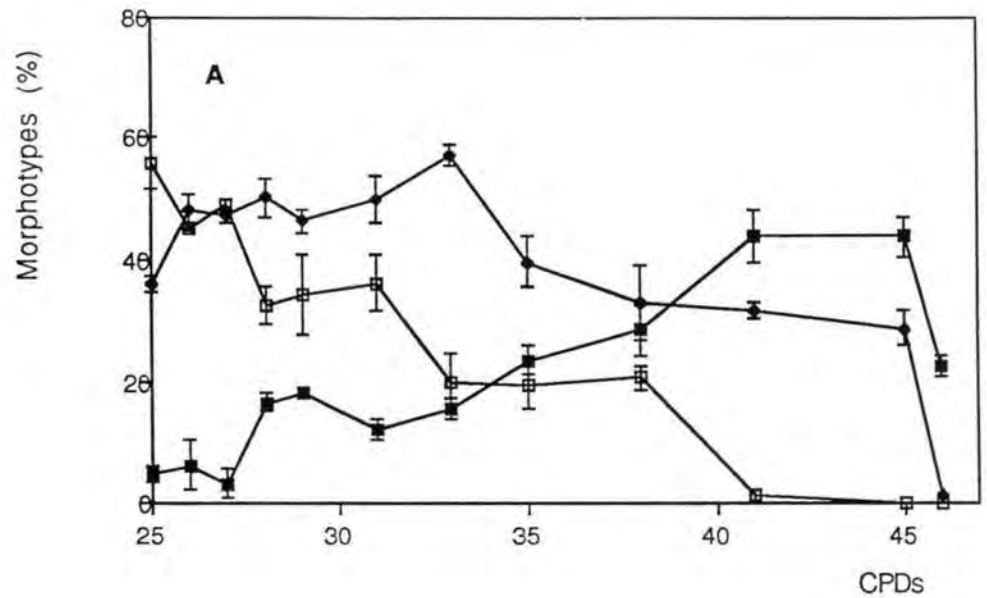


Figure 1.9.(A et B). Proportions des morphotypes des fibroblastes WI-38 en fonction des passages (CPDs). A: morphotypes mitotiques MF I ( $\square$ ), MF II ( $\bullet$ ), MF III ( $\blacksquare$ ). B: morphotypes post-mitotiques PMF IV ( $\square$ ), PMF V ( $\bullet$ ), PMF VI ( $\blacksquare$ ), PMF VII ( $\circ$ ).

et la Progérie. La Progérie est une maladie caractérisée par un ralentissement de la croissance : l'enfant reste nain. La maturité sexuelle n'est pas atteinte et les malades meurent avant l'âge de trente ans. On observe aussi une athérosclérose associée impliquant les vaisseaux sanguins majeurs comme l'aorte et les artères coronaires même chez des patients âgés de neuf ans. Dans le syndrome de Werner, les personnes se développent normalement jusqu'à l'âge adulte. A ce moment, le vieillissement apparaît beaucoup plus rapidement : cheveux gris, changement de la texture de la peau, ostéoporose, atrophie du cerveau,... La moyenne de vie est de quarante-sept ans.

Au niveau cellulaire, on constate que les fibroblastes provenant d'individus atteints du syndrome de Werner ou de la Progérie et qui donc vieillissent prématurément, ne peuvent atteindre que cinq à dix générations une fois mis en culture. Cet argument peut être porté au crédit de l'existence d'une relation inverse entre le vieillissement *in vivo* et le vieillissement *in vitro* (Tableau 1.3 (b)).

#### 4.3. Pourquoi avoir choisi les fibroblastes comme modèle expérimental pour l'étude du vieillissement *in vitro* ?

Parmi les nombreux types cellulaires actuellement cultivés, les fibroblastes représentent un bon modèle pour tester le modèle théorique. En effet, le passage de ce type cellulaire par différents états lors du vieillissement *in vivo* et *in vitro* a été décrit dans plusieurs articles. Bayreuther et al (1988, 1989) ont décrit sept types de fibroblastes dans les lignées HH-8 (fibroblastes dermiques humains) et WI-38 (fibroblastes de poumon foetal humain) biochimiquement et morphologiquement distincts (fig 1.8 (a, b)). Les trois premiers types sont appelés morphotypes mitotiques (MFI à MIII). Les morphotypes MFI sont de petites cellules en forme de fuseau, les morphotypes MFII sont de petites cellules épithéloïdes et les morphotypes MFIII sont des cellules plus grandes et pléiomorphes. Viennent ensuite les cellules post-mitotiques viables (PMFIV à PVII). Les morphotypes IV sont de longues cellules en forme de fuseau dont les contours forment des creneaux. Les morphotypes V sont de grandes cellules épithéloïdes avec un rapport noyau / cytoplasme plus élevé. Les morphotypes VI ont une très grande surface et les morphotypes VII sont des cellules en dégénérescence. Si l'on observe l'évolution des morphotypes MFI, MFII et MFIII en fonction du nombre de génération, on constate qu'aux premières générations, les cellules de type MFI sont majoritaires mais que progressivement, elles sont remplacées par les morphotypes MFII puis finalement les cellules de type III qui deviennent majoritaires à la fin de la culture. Les cellules de type IV, V, VI et VII ne sont présentes que dans les toutes dernières générations au moment où les cellules ne se divisent plus ou très peu (fig 1.9. A et B).



## 5. Effets des stress sur le vieillissement cellulaire *in vitro* : applications du modèle théorique (Toussaint et al., 1992a)

Dans le point précédent, nous avons décrit pourquoi les fibroblastes étaient un bon modèle pour l'étude du vieillissement *in vitro*.

On a utilisé ce modèle expérimental afin de tester l'effet de stress peu ou pas cytotoxiques de natures diverses sur l'évolution de ces divers types morphologiques cellulaires ou autrement dit, si de telles fluctuations sont capables de provoquer une accélération du passage d'un état stationnaire à un autre état.

On a tout d'abord déterminé l'évolution des proportions des divers morphotypes au cours de deux types de stress, les molécules stressantes étant le tert-butylhydroperoxyde (TBHP) qui génère des radicaux libres et l'éthanol. Les concentrations et les durées de stress furent choisies en fonction d'une toxicité limitée sur les cellules. Les proportions des divers types morphologiques (MFI à III, PMFIV à VII) ont été ensuite comparées à celles de la culture témoin de passage correspondant. Les constatations faites lors de ces expériences basées sur l'effet d'un stress unique furent les suivantes : après un stress, la proportion relative des cellules de type I diminue. La proportion relative des cellules de type II diminue ou reste stable, par contre, celle des types III augmente fortement. La proportion relative des cellules de type IV augmente dans le cas de stress intenses. Elle augmente peu ou diminue pour les stress de plus faible intensité. Des stress ont aussi été réalisés à chaque passage en culture et la même conclusion peut être tirée quant à l'effet des stress sur les proportions des différents types morphologiques. On peut déduire des observations que

1. Tous les types morphologiques peuvent subir un passage prématuré à un stade ultérieur sous l'effet de stress.
2. La différence du niveau d'erreurs entre le stade III et IV est importante, puisque peu de cellules de types IV à VII apparaissent après le stress.
3. Les cellules de type âgé dépassent plus facilement le seuil critique et meurent à la suite du stress unique.

Ces conclusions sont en accord avec le modèle théorique qui prévoit le passage accéléré des cellules suite à une fluctuation importante, d'un niveau de fonctionnement à un autre ayant un niveau d'erreurs plus élevé. La même interprétation peut s'appliquer aux résultats obtenus après des stress successifs.

Pour tenter d'expliquer ces résultats d'après le modèle, les études se sont portées sur le rôle joué par le métabolisme énergétique dans la survie des cellules confrontées à un stress et dans leur passage à d'autres états stationnaires suite à ces stress mais aussi l'effet d'une diminution des défenses cellulaires lors d'un stress, ce qui

faciliterait le passage à des états stationnaires ultérieurs (Toussaint, 1992b). Les résultats de ces travaux suggèrent que le niveau du métabolisme énergétique de la cellule module l'intensité de la réponse cellulaire à des perturbations d'origine extracellulaire de toute nature. Ce niveau détermine non seulement la survie de la cellule lors d'un stress mais aussi son passage prématuré à un nouvel état stationnaire qu'elle aurait atteint plus tard dans son vieillissement normal.

La conclusion des expériences réalisées est que le passage prématuré de la cellule à un nouvel état stationnaire et la survie cellulaire après un stress ne dépendent pas seulement du niveau des défenses spécifiques au stress encouru mais aussi de la capacité relative de réaction du métabolisme énergétique par rapport à l'intensité du stress. Ces arguments appuient le modèle théorique développé précédemment.



## 6. Toxicité de l'éthanol et du tert-butylhydroperoxyde (TBHP)

Nous avons montré les points forts de l'utilisation du modèle expérimental du vieillissement des fibroblastes WI-38 en culture pour tester diverses hypothèses du modèle théorique. En effet, ces cellules passent par sept états différents au cours du vieillissement *in vitro*, états que l'on a assimilé aux divers états stationnaires postulés par le modèle théorique. C'est pourquoi, ce modèle a été utilisé non seulement pour caractériser l'évolution des proportions des morphotypes au cours de passages en culture mais aussi pour montrer l'effet d'un stress unique ou de stress répétés sur le passage accéléré vers des morphotypes qui apparaissent plus tardivement lors du vieillissement normal (Toussaint et al, 1992).

L'objectif de notre travail sera de tester l'effet des stress non plus d'un point de vue morphologique (Toussaint, 1992), mais bien d'un point de vue biochimique par l'analyse de distributions de protéines par la technique des gels en deux dimensions. Les molécules stressantes que nous utiliserons seront le TBHP et l'éthanol. Afin de pouvoir interpréter leurs effets sur le modèle d'étude, il était intéressant d'examiner tout d'abord certains de leurs effets toxiques connus.

### 6.1. Toxicité de l'éthanol

#### 6.1.1. Effet de l'éthanol sur l'augmentation de la perméabilité au calcium du réticulum sarcoplasmique du muscle strié squelettique (Ohnishi et al., 1984 ; Adickes, 1990)

Lors de l'alcoolisme aigu ou chronique, on constate très souvent une diminution générale de la contractibilité du muscle strié squelettique. Le mécanisme d'action de l'éthanol viendrait de sa capacité à interférer avec l'activité de certaines protéines contractiles. D'autre part, on sait que l'éthanol possède un effet identique aux anesthésiants en provoquant une fluidification des membranes.

Au niveau du muscle strié squelettique, les événements cruciaux de la contraction/relaxation du muscle sont initialement reliés aux phénomènes de capture et rejet du calcium par le réticulum sarcoplasmique. Des travaux réalisés par Ohnishi et al., on peut retenir trois sites possibles de l'effet de l'éthanol sur la membrane du réticulum sarcoplasmique :

1. L'éthanol pourrait agir sur l'ATPase  $\text{Ca}^{++}$ -  $\text{Mg}^{++}$  (pompe à calcium).
2. L'éthanol pourrait agir sur une sous-unité régulatrice des canaux calciques : l'éthanol agirait alors en augmentant la taille d'ouverture du canal.
3. L'éthanol pourrait enfin agir sur la bicouche lipidique en la rendant plus fluide.

Cette augmentation de la fluidité membranaire du réticulum sarcoplasmique affecterait la conformation des protéines entrant dans la constitution des canaux calciques, entraînant ainsi une augmentation de la taille d'ouverture des canaux.

De telles modifications au niveau de la conformation de ces canaux seraient à l'origine des dysfonctionnements du muscle strié squelettique observé lors d'intoxication à l'éthanol.

#### 6.1.2. Effet de l'éthanol sur l'induction des peroxydations lipidiques, la mobilisation du fer et la génération des radicaux libres (Cederbaum, 1989)

Lors du métabolisme de l'éthanol et de l'acétaldéhyde, sous-produit de l'oxydation de l'éthanol par l'alcool déshydrogénase (ADH), des radicaux libres peuvent être générés par des oxydases dépendantes du molybdène présentes dans certains types cellulaires.

A partir de là, surviennent toute une série de réactions catalytiques en chaîne. En effet, le fer de la ferritine peut être mobilisé par de tels radicaux et à son tour servir de fer catalytique et participer à la réaction de Fenton qui donne naissance à la peroxydation lipidique.

Afin d'être complets, voici répertoriés ci-dessous les mécanismes possibles par lesquels l'éthanol peut réaliser les stress oxydatifs :

Table 2. Suggested Mechanisms for Promotion of Oxidative Stress by Ethanol

Depletion of GSH—acute vs. chronic, oxidative pools
Direct toxic effect of ethanol on membranes
Metabolic effect of ethanol
Acetaldehyde—direct, metabolic, substrate
Redox state
Ethanol radicals— $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}^\bullet$ , $\text{CH}_3\text{CHOH}^\bullet$ , ethanol scavenges $^\bullet\text{OH}$ , OR
Ethanol-induced cytochrome P-450 as a Fenton/Haber-Weiss catalyst
Chronic effect of ethanol
Mitochondrial injury
Microsomal proliferation and induction
Hypermetabolic state
Increased hepatic iron levels
Conversion of XDH to XO
Effects on antioxidative defense
Release of chemoattractants

#### 6.1.3. Influence de l'éthanol sur la fluidité membranaire et la migration des cellules tumorales (Silberman et al., 1990)

L'altération de la fluidité membranaire peut être induite *in vitro* par des alcools aliphatiques. Ainsi, l'éthanol et d'autres alcools à courte chaîne carbonée sont capables de pénétrer dans la double couche lipidique des membranes cellulaires afin d'en



augmenter la fluidité. Mais l'éthanol possède également la capacité d'induire des variations dans la structure et l'organisation des proportions en phospholipides et en acides gras. Or, une relation directe entre l'augmentation de la fluidité membranaire et la potentialité d'une cellule tumorale à former des métastases a pu être mise en évidence. Il semble donc que les changements induits par l'éthanol au niveau des propriétés de surface des cellules telles que la fluidité ou la composition de la bicouche lipidique, suggèrent que l'éthanol affecte la migration cellulaire et l'invasion des cellules néoplasiques lorsqu'elles ont été traitées avec de l'éthanol.

D'autre part, l'éthanol peut affecter la fonction du cytosquelette. En effet, French et al. (1987) ont montré l'inhibition de la contraction des microfilaments et l'induction de la formation de filaments intermédiaires anormaux chez des hépatocytes exposés à l'éthanol. Ils ont mis en évidence sa capacité de renforcer l'activation de la phospholipase C médiée par récepteur, concourant à l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire dans des hépatocytes intacts : augmentation qui affecte dès lors la polymérisation de l'actine et mène à une distribution anarchique de l'actine F. Les changements au niveau de cette actine peuvent être reliés à l'augmentation de la migration des cellules néoplasiques.

#### 6.1.4. Effets temporels de l'éthanol au niveau des fibroblastes de poumon foetal humain

Le syndrome foetal atteint 2 naissances sur 1000 et touche 1/3 des enfants dont la mère a consommé plus de 150 g d'alcool par jour durant la grossesse. Les symptômes sont liés à la taille et au développement du cerveau. Ainsi, on observe : un retard de croissance pré- et post- natale, une microcéphalie, une hypoplasie du maxillaire et un retard mental (Quotient Intellectuel (QI) entre 50 et 70). De plus, des anomalies squelettiques et des déficiences cardiaques et urogénitales constituent des complications fréquemment observées. Notons également que la réduction du taux de croissance et les anomalies mentales sont irréversibles.

Il semblerait que le mécanisme de la toxicité de l'éthanol serait une inhibition directe de la prolifération des cellules embryonnaires au début de la grossesse. Les travaux de Barnes et al. (1990) ont montré qu'en fait l'éthanol déprime le taux de protéines collagéniques et non collagéniques; cependant il est incapable d'affecter l'incorporation de la thymidine dans l'ADN. Ils ont aussi constaté qu'il provoque une augmentation de la dégradation des protéines, ce qui contribue à une réduction nette de la production en protéines. Enfin, il semble que le mécanisme par lequel l'éthanol induit des anomalies développementales est en partie dû à sa potentialité à altérer les modifications post-translationnelles des protéines.

#### 6.1.5. Conclusion

On constate donc que les effets de l'éthanol sont multiples et que son site d'action se situe au niveau de nombreuses fonctions cellulaires dans divers types cellulaires et organes.

#### 6.2. Toxicité du tert-butylhydroperoxyde (TBHP)

Le tert-butylhydroperoxyde est une molécule amphiphile qui pénètre aisément dans les cellules et mime l'effet toxique des acides gras peroxydés. Des radicaux peroxydes sont générés dans le cytosol par l'interaction du TBHP avec le fer participant ainsi à une réaction similaire à la réaction de Fenton. Notons que le TBHP peut agir également indirectement en inhibant la glutathion peroxydase et sa présence dans la cellule diminue la quantité de glutathion réduit. Suite à la production de radicaux libres, toute une série de perturbations surviennent dans la cellule telles que : une augmentation de la perméabilité membranaire suite aux peroxydations lipidiques, une élévation du calcium intracytoplasmique, une diminution du calcium intramitochondrial, une inhibition de la synthèse de l'ADN et de la mitose,... (Yuan et al., 1991, Tribble et al., 1988).



## 7. Les gels d'électrophorèse en deux dimensions (2D)

### 7.1. Introduction

L'analyse électrophorétique en gel 2D permet de séparer, d'identifier et de quantifier un mélange complexe de protéines grâce à la combinaison dans un premier temps, de l'électrofocalisation (IEF) en présence d'urée et d'un détergent neutre et d'une électrophorèse à l'aide de grands gels plats en conditions dénaturantes par l'utilisation du SDS au cours de la seconde dimension (Klose, 1975; O'Farrel, 1975; Iborra et Bulher, 1976).

La séparation électrophorétique est basée sur deux propriétés indépendantes des protéines : d'une part leur charge, mise en évidence par le point isoélectrique (P.I.) et d'autre part, le poids moléculaire (P.M.) qui détermine la mobilité des complexes protéines-SDS dans les gels de polyacrylamide.

Chaque espèce polypeptidique individuelle apparaît dès lors après révélation sous forme de taches sur la matrice bi-dimensionnelle au niveau de laquelle la position de chaque tache est fonction à la fois de sa taille mais aussi de sa charge nette; l'intensité de chaque spot est le reflet de l'abondance cellulaire du polypeptide. C'est pourquoi, on dit que cette technique électrophorétique en deux dimensions possède un pouvoir analytique aussi bien qualitatif que quantitatif.

O'Farrel (1975) démontra le premier l'énorme puissance de cette technique lorsqu'il démontra qu'un tel procédé était capable d'analyser plus d'un millier de protéines et donc de détecter des composés représentant moins de 0,001% du total des protéines cellulaires.

Cette méthode a trouvé son application aussi bien dans la résolution de protéines d'organismes procaryotes que d'organismes eucaryotes mais elle peut également être utilisée pour caractériser les types cellulaires.

Cependant, une limite de cette technique est que les protéines basiques ne sont pas séparées de manière appréciable par le système IEF/SDS, du fait que de telles protéines pénètrent très peu à l'intérieur du gel IEF. Même lorsque des ampholines basiques supplémentaires sont ajoutées, l'extension du gradient de pH n'est que très faible car en présence d'urée, la région basique du gradient est instable. Si quelques protéines basiques qui pénètrent malgré tout dans le gel sous ces conditions, elles donneront toujours naissance à des traînées.

Néanmoins, il est possible d'outrepasser ce problème en utilisant une électrophorèse dont le gradient de pH est non-équilibré (NEPHGE) et cela au cours de la 1ère dimension (O'Farrel et al., 1977).

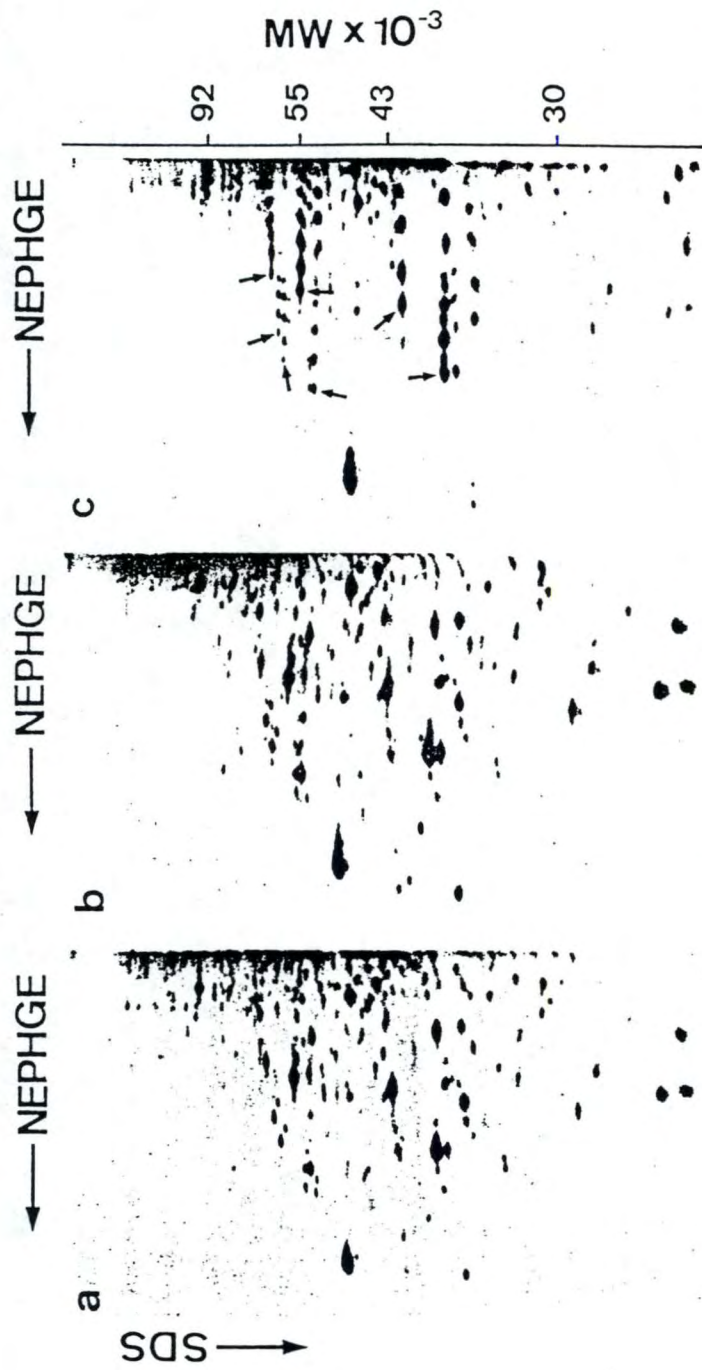


Figure 2. Effect of storage and heating of the samples on protein separation: (a) control sample; (b) sample kept for 3 months at  $-80^{\circ}\text{C}$ , period during which it was thawed and frozen several times; (c) sample heated for 1 min at  $100^{\circ}\text{C}$  in lysis buffer. Arrows indicate the position of the original spot. Gels were run as described in Section III. Basic side is on the left, acidic side is on the right.

D'après Celis et Bravo, 1984.

Figure 1.10(a, b et c). Effet du stockage et de l'élévation de la température des échantillons sur la résolution : (a) échantillon contrôle ; (b) échantillon qui a été gardé pendant trois mois à  $-80^{\circ}\text{C}$  et qui a été décongelé et recongelé à plusieurs reprises ; (c) échantillon dans du tampon de lyse qui a été chauffé pendant une min à  $100^{\circ}\text{C}$ .



Les principales différences entre NEPHGE et IEF émanent non seulement du fait que les échantillons sont appliqués du côté acide du gel mais également que le produit du temps par le voltage est plus petit que dans l'IEF.

Dans de telles conditions, le gradient de pH n'atteint pas le plein équilibre. En conséquence, les protéines ne sont plus équilibrées totalement en fonction de leur point isoélectrique comme c'est le cas pour les gels IEF.

## 7.2. Commentaires importants

### 7.2.1. Effet du stockage et de la température sur les échantillons

Les échantillons non radioactifs peuvent être gardés plusieurs mois à  $-70^{\circ}\text{C}$  dans un tampon de lyse des cellules sans que cela n'affecte la résolution (séparation) des protéines y compris quand les échantillons ont été décongelés et recongelés à plusieurs reprises (fig 1.10.(b)).

Cependant une élévation de la température de l'échantillon de  $80^{\circ}$  à  $100^{\circ}\text{C}$  pendant une minute dans le tampon de lyse (LBr) produit une modification de la migration (fig 1.10.(c)). Ceci est principalement dû à la carbamylation des protéines par l'isocyanate produit par décomposition de l'urée et qui a pour conséquence un changement dans le point isoélectrique des protéines. Il est donc évident (d'après l'analyse de la fig 1.10.(c)) que toute une série de spots artéfactuels avec diverses valeurs de pH seront produits à partir du polypeptide d'origine. C'est pourquoi, on réchauffera l'échantillon placé dans du tampon de lyse à une température de  $37^{\circ}\text{C}$ .

### 7.2.2. La capacité de chargement

La capacité de chargement d'un gel dépend de la nature de l'échantillon appliqué. Prenons le cas d'un lysat cellulaire total : l'énorme différence dans les quantités relatives des divers polypeptides cellulaires affecte le pouvoir de résolution de la technique.

Par exemple dans les cellules HeLa, l'actine représente 3% des protéines totales alors qu'un composant mineur peut représenter moins de 0,0001% des protéines cellulaires totales.

On peut dès lors se poser la question de savoir ce qu'il va se passer.

On constate que si une trop grande quantité de protéines est appliquée sur le gel, la taille des spots augmente, ce qui, réduit la distance entre les spots voisins l'un de l'autre et donc une perte considérable de résolution.

Autre conséquence : le déplacement d'un composé mineur de sa position originelle par un composé majeur voisin de celui-ci (fig 1.11.).



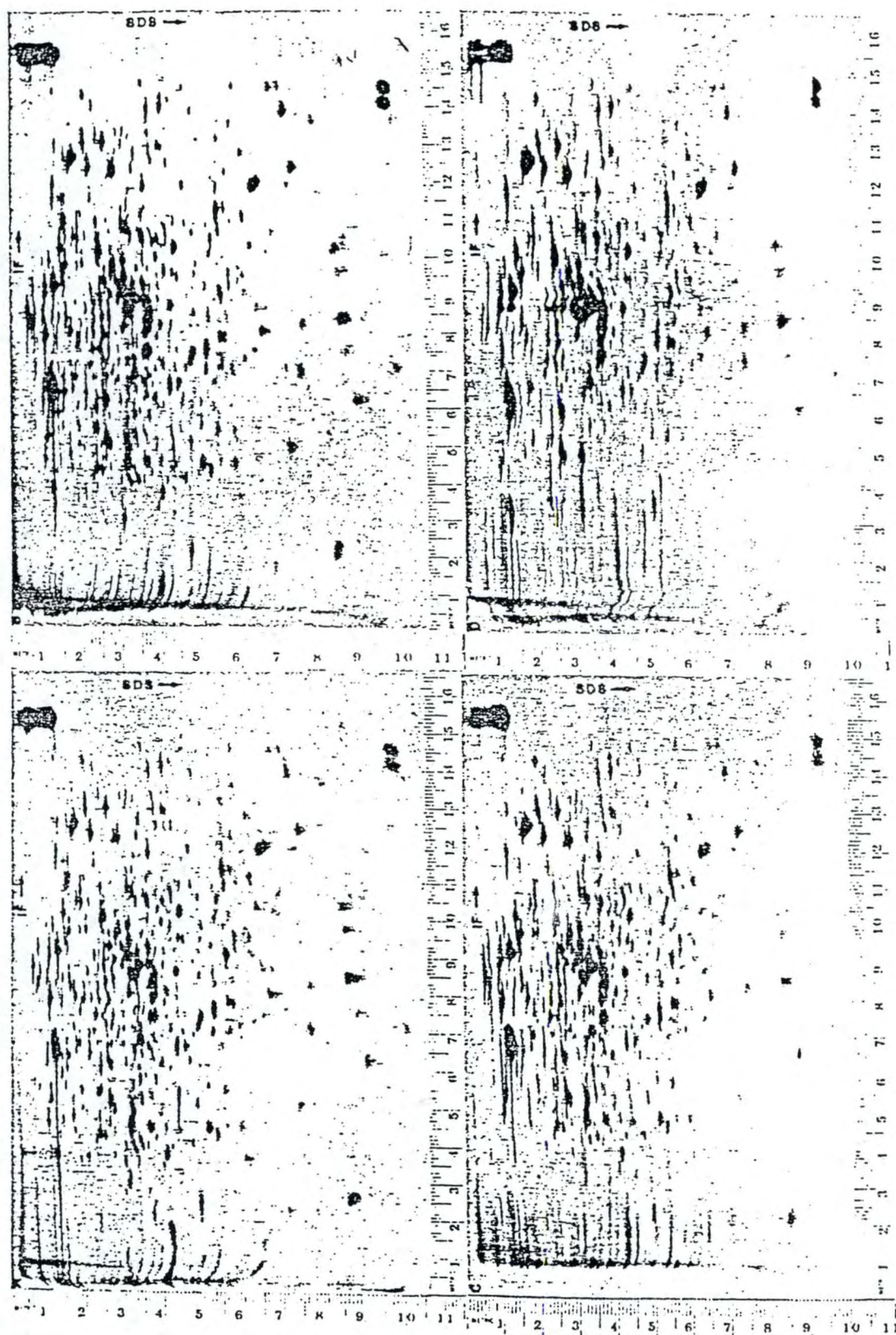


FIG. 5. Effect of increasing the amount of protein on the resolution is illustrated by the four two-dimensional separations shown. In all cases 350,000 cpm in  $4\mu$  g of  $^{14}\text{C}$ -labeled *Escherichia coli* protein were loaded on the gel. In addition, 3, 16, 32, and 128  $\mu$ g of unlabeled *E. coli* protein were loaded on Gels A, B, C, and D, respectively. These preparations of *E. coli* protein were not treated with RNase and DNase. The slab gel is a uniform gel of 12.5% acrylamide. The autoradiograms illustrated were exposed for 72 hours.

D'après O'Farrel, 1975.

Figure I.11. Effet de l'augmentation de la quantité de protéines appliquées sur un gel sur le pouvoir de résolution



Comme l'a démontré O'Farrel (1975), la taille d'un spot n'est pas influencée par la quantité de protéines lorsque moins de 0,1 µg de protéines est appliquée sur le gel.

Par exemple : dans les cellules HeLa ou d'E.Coli, la quantité maximale de protéines qui peut être chargée sur le gel sans pour cela affecter la résolution de toute autre protéine majeure doit représenter 1 à 3 µg des protéines totales parce que le composé majeur représente 10% des protéines totales. Notons cependant qu'il n'y a que quelques protéines majeures, de sorte que, 10 à 20 µg des protéines totales peuvent être appliquées sur le gel sans pour cela affecter de façon drastique la résolution.

#### 7.2.3. Equilibration du gel dans le tampon de la deuxième dimension

Durant cette étape, les protéines diffusent et une certaine quantité est perdue.

Cette quantité perdue dépend du temps d'incubation. En effet, par exemple, si l'on emploie un temps d'incubation de 2 heures, alors 50% de la radioactivité de départ peuvent être perdus.

C'est pour cette raison qu'il est recommandé de ne pas prolonger cette étape au-delà de 30 minutes.

#### 7.2.4. Sensibilité et détection

Pour rappel, l'électrophorèse en deux dimensions est un procédé suffisamment sensible que pour détecter des protéines mineures contenant entre 0,0001 et 0,00001% de la radioactivité totale appliquée (O'Farrel, 1975; Garrels, 1979; Duncan et Mc Conkey, 1982).

Cela signifie donc qu'en principe, la capacité de la technique à révéler les composés à l'état de traces n'est pas limitée par la sensibilité de la méthode de détection.

En réalité le problème majeur pour la détection des protéines mineures réside dans l'existence de l'énorme différence d'abondance des polypeptides divers constitutifs d'une cellule eucaryote.

En effet, si les protéines majeures peuvent représenter jusqu'à 3 à 5% de la radioactivité totale, les protéines mineures, quant à elles, représentent une valeur inférieure à 0,0001% de la radioactivité totale. Dans les conditions d'autoradiographie, les composés majeurs seront surexposés d'un facteur  $10^4$ ,  $10^5$  fois, donnant ainsi naissance à des spots au moins 15 à 20 fois plus larges que leur taille réelle, ce qui réduit le pouvoir de résolution.

Dans les phénomènes biochimiques complexes tels que la régulation de la croissance, la transformation cellulaire, la réponse hormonale, les changements qui se produisent sont habituellement plus quantitatifs que qualitatifs et de telles études dépendent fortement de la résolution et de la sensibilité du système d'analyse.



**Figure 6.** Increased resolution in two-dimensional gels. Typical separation of acidic proteins (IEF) when larger gels in both dimensions are used. (IEF,  $1.2 \times 200$  mm; SDS gel,  $200 \times 200$  mm). The IEF and SDS gels have the same composition as described in Section III.

D'après Celis et Bravo, 1984.

**Figure I.12.** Amélioration du pouvoir de résolution par l'utilisation de gels plus larges au cours de la seconde dimension.



C'est pourquoi, une méthode quantitative d'analyse des résultats comme le scanning des autoradiographes et le processing informatique des données est indispensable. Pour améliorer l'analyse, on utilise aussi des gels plus larges dans la seconde dimension (fig 1.12.).

#### 7.2.5. Pourcentage de radioactivité initialement appliquée retrouvée dans la seconde dimension

Au cours des diverses étapes des gels 2D, une certaine quantité de protéines appliquées initialement est perdue.

Une représentation schématique de la récupération des protéines à chacune des étapes est donnée à la fig 1.13.

Que constatons-nous? Quand de tels systèmes sont utilisés pour l'analyse de lysats cellulaires totaux, ni le système IEF-SDS, pas plus que NEPHGE-SDS seuls, ne sont suffisants et ils doivent donc être utilisés en association.

Comme présenté dans cette figure 1.13. : 30 à 35% de la radioactivité totale appliquée n'entre pas dans les gels IEF.

Pour les gels non équilibrés (NEPHGE), 70 à 75% des protéines marquées sont absentes du gel. On constate également, que, dans les 2 cas, les pertes à chacune des étapes sont parallèlement similaires.

Dans les grands gels plats IEF, la quantité de radioactivité est de plus ou moins 52 à 57% du total appliqué, tandis que dans les grands gels plats NEPHGE, elle est de 20 à 22%.

Si ces deux systèmes sont utilisés simultanément pour la séparation de polypeptides radioactifs d'un lysat total, 95% des composants seront analysés en supposant donc que les pertes de protéines lors des étapes suivant la première dimension sont non sélectives.

#### 7.2.6. Reproductibilité

Lorsque l'on réalise la migration d'un même échantillon sur deux gels différents en deux dimensions, on constate que chaque tache présente sur un gel en un endroit précis correspond à une et une seule tache sur l'autre gel (fig 1.14.).

Afin d'obtenir de tels résultats, il faut veiller à réaliser la migration de la première dimension durant les mêmes périodes de temps pour les deux gels à comparer; sinon, une légère variation au niveau de l'extrémité basique apparaît et cette légère perturbation provoque des ambiguïtés pour la superposition de 1% des spots dans ce cas.

Par contre, les gels SDS de seconde dimension peuvent migrer pendant des temps différents sans que cela n'affecte la reproductibilité.

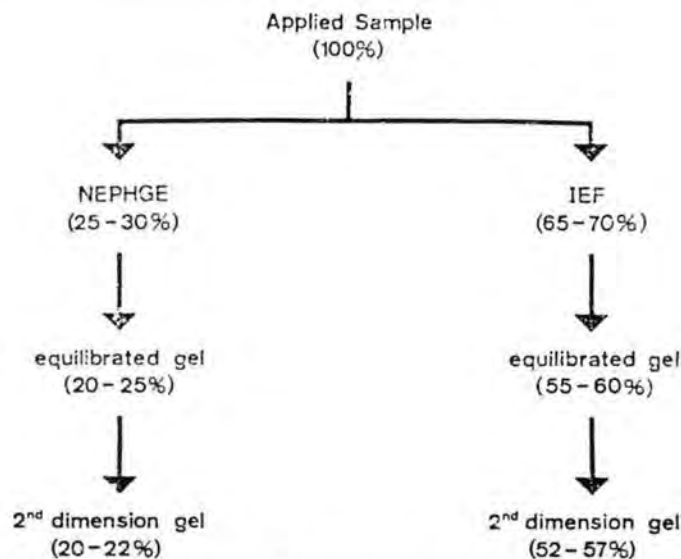


Figure 7. Percentage of recovery of the applied sample when using NEPHGE-SDS or IEF-SDS systems. The values correspond to the percentages of radioactivity present in relation to the total applied. To determine the radioactivity that entered the first dimension, the gels were cut in 0.5-cm slices, each of which was incubated in 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ -2%  $\text{NH}_4\text{OH}$  at  $37^\circ\text{C}$  overnight. Samples were counted in 10 ml of Biofluor. The amount of radioactivity lost during the equilibration step was calculated by counting the incubation media. The percentage of radioactivity present in the slab gel was determined by direct counting of the gel. After fluorography and drying, the gel was cut into  $2\text{-cm}^2$  pieces, each of which was put into scintillation fluid and counted for 10 min. In all cases the values are the average of at least four independent determinations. The counts were corrected according to the counting efficiency calculated for each determination. The sample analyzed consisted of asynchronous HeLa cells labeled for 20 h with [ $^{35}\text{S}$ ]methionine. Labeling of the cells, sample preparation, and running of the gels were performed as described in Section III.

D'après Celis et Bravo, 1984.

Figure I.13. Pourcentage de radioactivité retrouvée au niveau de la seconde dimension selon que l'on utilise le système NEPHGE ou IEF au cours de la première dimension.

D'après O'Farrel, 1975.



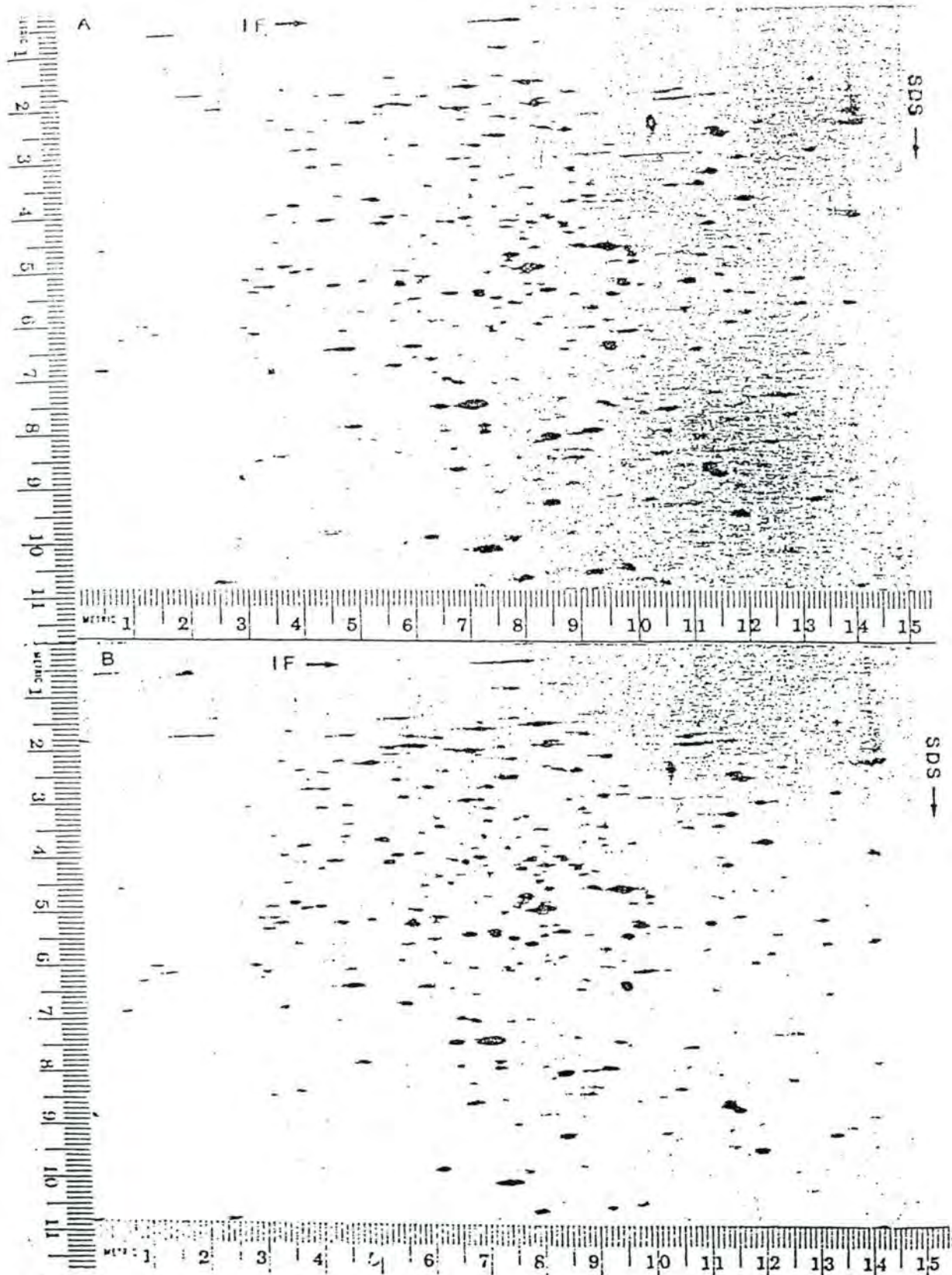


FIG. 7. Positional reproducibility is illustrated in this figure as well as Fig. 5, A and B. The samples subjected to electrophoresis in these gels were prepared from *Escherichia coli* 5333 (19) (cyclic adenosine 3':5'-monophosphate binding protein mutant) grown in the presence of adenosine 5'-monophosphate (A) or cyclic guanosine 3':5'-monophosphate (B). These samples contained 300,000 cpm and approximately 15  $\mu$ g of protein. The isoelectric focusing

gels were run at the same time, equilibrated for 30 min, and on 9 to 15% exponential, acrylamide gradient, slab gels in the front chamber. The gels were exposed for 30 hours. A slight difference in growth conditions for the bacteria used to prepare the two samples has resulted in several quantitative differences which are evident on close inspection.

Figure I.14. Reproductibilité de la technique des gels d'électrophorèse en deux dimensions.



On soupçonne dès lors la puissance d'une telle technique : en effet, si la migration est réalisée dans des conditions optimales (mêmes conditions de migration d'un gel à l'autre), alors l'électrophorèse en deux dimensions devient la technique de choix pour tout chercheur désireux non seulement de déterminer la composition protéique d'un type cellulaire donné mais également d'analyser les effets encourus par un ou plusieurs composants du mélange polypeptidique lors de mutations comme les insertions, les délétions, la génération des codons non-sense ou lors de l'action de certaines hormones au niveau des gènes.

#### 7.2.7. Distribution des protéines

La distribution des protéines au niveau des gels à 2D est aussi un facteur susceptible d'affecter la résolution du système. En effet, si les protéines sont confinées en de petites régions du gel, il est évident que le pouvoir de résolution total sera très faible même si les tâches sont très petites.

En fait, bien que les protéines peuvent différer substantiellement par leur poids moléculaire et leur point isoélectrique, la majorité des polypeptides présentent un poids moléculaire (PM) et des points isoélectriques (PI) similaires. C'est pourquoi, une série de mélanges divers d'ampholines ont été testés afin d'obtenir un gradient de pH qui donne une distribution uniforme des protéines (O'Farrel, 1975). De telles expériences, il ressort que le gradient de pH ne peut s'étendre au-delà de pH 7, car toute extension au-delà de cette valeur conduit à une large perte en résolution pour les protéines.

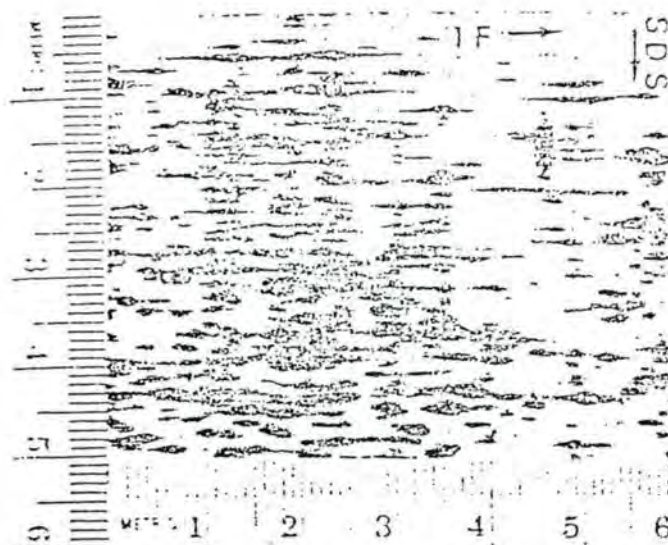
En ce qui concerne la seconde dimension, bien que la distribution des protéines peut être drastiquement altérée en modifiant la porosité du gel de migration, il n'existe pas de concentration en acrylamide qui puisse donner une distribution uniforme des protéines. La meilleure résolution obtenue est atteinte lorsqu'on utilise un gel en gradient exponentiel. Un gel uniforme à 10% d'acrylamide fournit une distribution uniforme des protéines à travers le gel, cependant, un certain nombre de protéines sont perdues au niveau du front de solvant. Néanmoins, pour plus de facilité, étant donné que les gels en gradients sont complexes à réaliser, nous avons travaillé à l'aide de gels uniformes à 10% d'acrylamide.

Enfin, la mobilité des protéines lors de la seconde dimension est proportionnelle au log de leur poids moléculaire.

#### 7.2.8. Les ampholines

Pour la séparation des protéines par le procédé de l'électrofocalisation, il est nécessaire d'établir un gradient linéaire stable. Les ampholines sont des molécules qui sont utilisées pour générer un gradient de pH durant l'IEF. Les ampholines





habituellement utilisées sont celles décrites par Vesterberg (1976), qui sont composées d'isomères et d'homologues d'acides polyaminocarboxyliques aliphatiques avec des valeurs de pH allant de 2,5 à 11.

Ces ampholines doivent posséder certaines propriétés telles que : (1) la même conductivité au point isoélectrique, (2) une solubilité au point isoélectrique, (3) une interaction minimale avec les protéines qui migrent (LKB Product Manual, 1979).

#### 7.2.9. Hétérogénéité de charges

L'hétérogénéité de charge peut être due à des modifications obtenues *in vivo*, comme des phosphorylations, des acétylations ou l'addition de glucides chargés, ou cela peut être dû à des modifications artéfactuelles.

Une hétérogénéité artéfactuelle de charges d'une seule protéine produit un pattern distinct qui peut être détecté même dans un mélange complexe de protéines. En effet, les taches produites par une protéine possédant une hétérogénéité de charge se présentent sous forme d'une série de taches possédant le même poids moléculaire (mobilité similaire au niveau de la seconde dimension), mais l'espace entre les taches est en accord avec une différence d'une seule charge entre les taches consécutives.

Dans ce genre de distribution de protéines, chaque spot se présente sous forme de multiples spots (fig 1.15.) et donc, de telles inductions artéfactuelles d'hétérogénéité de charges réduisent l'utilité de cette technique d'autant plus que dans la plupart des cas, la cause de l'hétérogénéité n'est pas connue. En effet, il existe des protéines bien caractérisées pour lesquelles on ne connaît aucune modification *in vivo* et donc pour lesquelles la cause de l'hétérogénéité demeure inconnue.

#### 7.2.10. Artéfacts possibles

La formation de spots multiples peut aussi être due à des effets de solubilité. De tels spots artéfactuels peuvent être aisément détectés car en général des traînées sont associées à ces taches. De plus, quelque ambiguïté peut survenir lorsque d'autres protéines migrent au niveau de ces traînées. Il est cependant possible d'outrepasser ce problème en augmentant les concentrations en urée et en NP-40 qui, en augmentant la solubilité, diminuent les artéfacts causés par l'insolubilité.

De plus, l'isocyanate formé lors de la décomposition de l'urée peut aussi provoquer la carbamylation des protéines. C'est pourquoi, il est nécessaire de prendre certaines précautions afin d'éviter cette carbamylation. Tout d'abord, toutes les solutions d'urée seront fraîchement préparées et seront stockées dans des aliquots gardés au congélateur; ensuite, dès que les protéines sont dissoutes dans la solution d'urée, leur utilisation doit



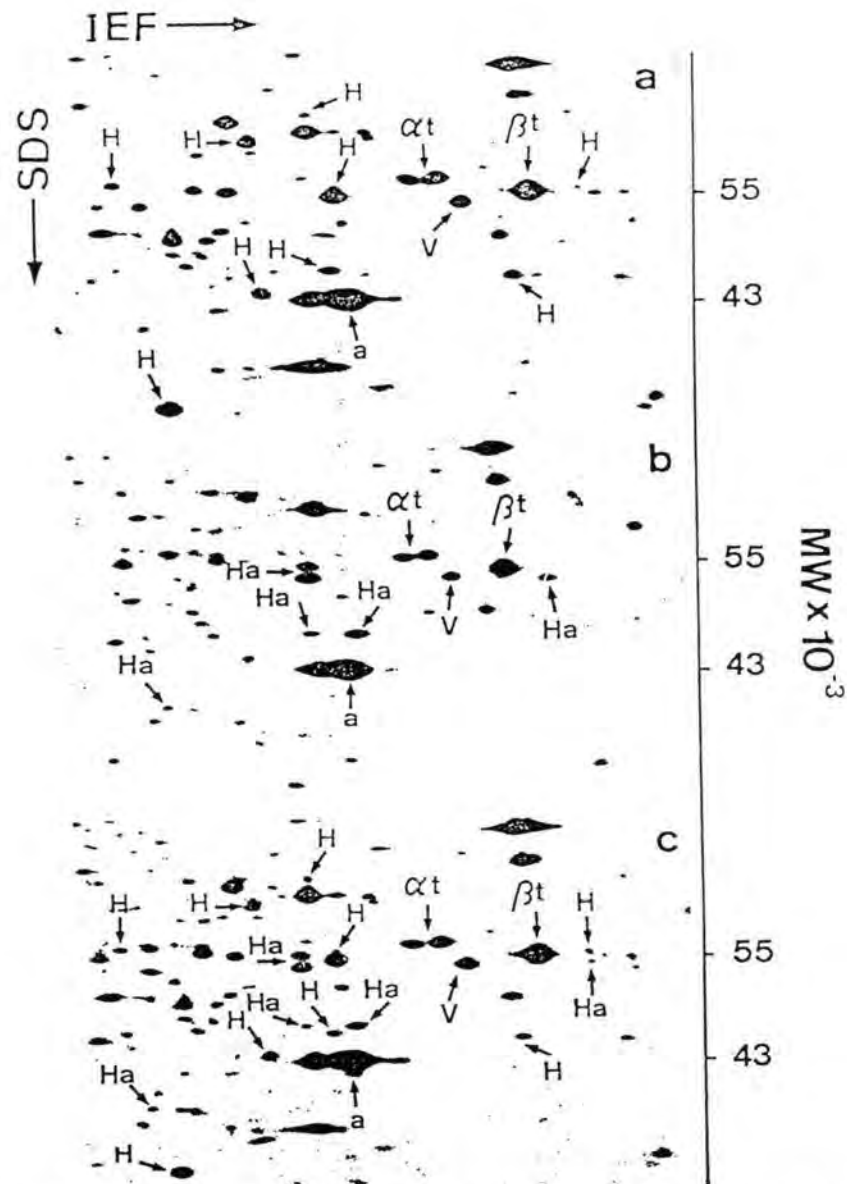


Figure 8. Comparison of acidic proteins (IEF) from hamster and human cells: (a) fluorograph of HeLa cell polypeptides; (b) fluorograph of Chinese hamster ovary (CHO) cell polypeptides; (c) coelectrophoresis of HeLa and CHO polypeptides. H, human-specific polypeptides; Ha, hamster-specific polypeptides; a, actin;  $\alpha t$ ,  $\alpha$ -tubulin;  $\beta t$ ,  $\beta$ -tubulin; v, vimentin. Only a fraction of the fluorograms is shown.

D'après Celis et Bravo, 1984.

Figure 1.16. Comparaison de mélanges complexes de protéines par la technique de migration simultanée d'échantillons différents sur le même gel.

être immédiate. Enfin, la pré-focalisation lors de la première dimension sert à ôter l'isocyanate.

#### 7.2.11. Comparaison de mélanges complexes de protéines

Cette comparaison de distributions de protéines provenant de sources diverses implique une recherche de variations en certains constituants portant sur mille polypeptides ou plus. Dans la plupart des cas, les différences peuvent être clairement détectées lors d'une inspection visuelle lorsque plusieurs patterns protéiques sont comparés côte à côte. Cependant, il subsiste des cas dans lesquels les différences entre les diverses cartes protéiques ne sont pas claires. En effet, si les conditions de migration pour chacun des gels diffère légèrement, de petites perturbations surviendront, ce qui rendra bien évidemment les comparaisons très difficiles.

Afin de déterminer ces incertitudes, on fera migrer un mélange de deux échantillons sur le même gel et on comparera les résultats obtenus avec les migrations individuelles de chacun des deux échantillons afin de déterminer ainsi l'origine des spots (fig 1.16.).

Cependant, il y a des circonstances pour lesquelles cette approche n'est pas suffisante, dans ce cas, une méthode plus persuasive, telle qu'une autoradiographie double-marquage est nécessaire. Dans cette technique, les échantillons protéiques à comparer sont marqués avec différents isotopes et électrophorés (voir Mc Conkey, 1979 et Choo et al, 1980). On veillera cependant à ce que l'intensité des spots de chacun des deux isotopes soient plus ou moins égaux pour des temps d'exposition identiques. Ceci assure que les spots de faible intensité soient détectables et que les protéines majeures ne soient pas surexposées.

Un autre type de procédé qui peut également être utilisé est le marquage partiel des peptides des protéines. Cette technique est très utile quand on recherche des protéines provenant de diverses sources et quand on recherche des différences entre des polypeptides dont l'identité est inconnue.

#### 7.2.12. Utilisation de marqueurs et de coordonnées ou comment outrepasser l'inconvénient majeur des électrophorèses en deux dimensions

L'inconvénient majeur des électrophorèses en deux dimensions est le problème de communication entre les divers laboratoires, puisque chacun de ces laboratoires utilise son propre système en deux dimensions. Il s'ensuit un manque de données précises afin de se référer sur la position exacte d'un polypeptide donné. En admettant que la technique des gels en deux dimensions sépare des protéines en fonction de leur charge (axe des X au cours de la première dimension) et de leur poids moléculaire (axe des Y au cours de la



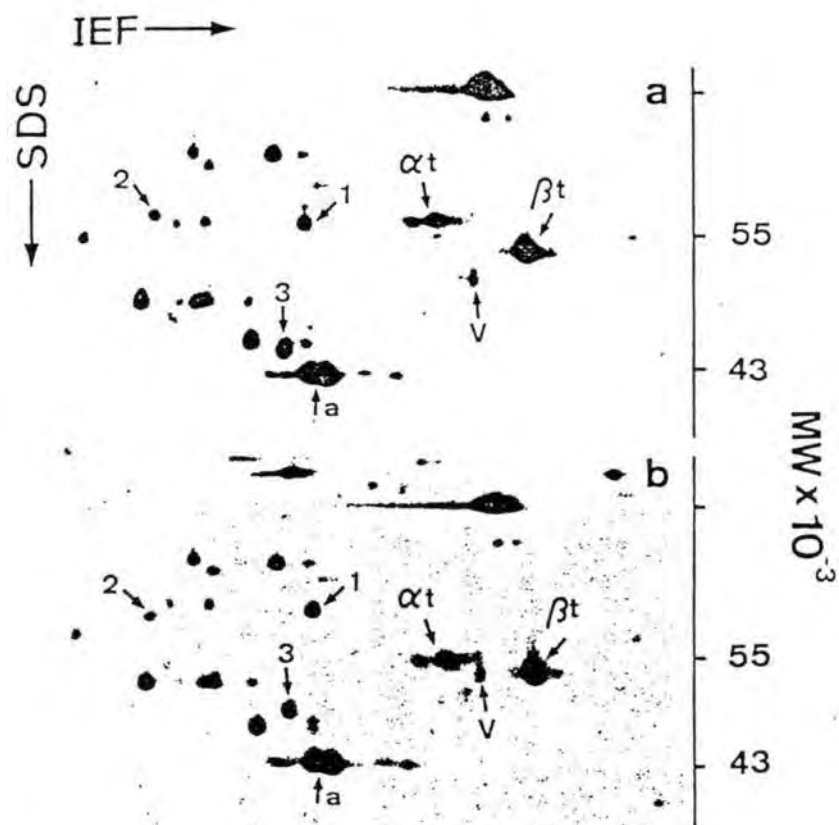


Figure 9. Effect of cross-linking on the apparent molecular weight of some proteins. (a) The ratio of acrylamide to bisacrylamide in the second dimension was 1 : 200. (b) The ratio of acrylamide to bisacrylamide used in the second dimension was 1 : 30. The size of the slab gels was identical. Only a small fraction of the gel is shown. a, actin;  $\alpha t$ ,  $\alpha$ -tubulin;  $\beta t$ ,  $\beta$ -tubulin; v, vimentin.

D'après Celis et Bravo, 1984.

Fig I.17. Effet de la concentration en bisacrylamide au cours de la seconde dimension sur le pouvoir de résolution des gels à deux dimensions.

seconde dimension), il semble que la manière la plus aisée pour localiser une protéine dans la carte protéique obtenue serait d'utiliser le PI et le PM comme coordonnées d'une tache.

De nombreuses raisons rendent inappropriée l'utilisation du pH comme axe des X. Premièrement, la présence de fortes concentrations en urée (9M) qui provoque une réduction de l'activité de l'ion hydrogène (Bull et al., 1964), rendent la mesure du pH imprécise. En second lieu, Ui (1971) a montré que l'urée pouvait exercer un effet direct sur l'électrode à pH. Ensuite, il est bien connu que les points isoélectriques mesurés dans l'urée sont altérés à cause de la dénaturation des protéines. Enfin, il existe de nombreux écarts entre les diverses valeurs de PI d'un même polypeptide cellulaire majeur suivant les publications (Krystal et al., 1978 ; Bravo et Knowland, 1979; Garrels, 1979). C'est pourquoi il est conseillé d'utiliser le PI comme axe des X.

Néanmoins le problème reste de savoir ce qu'il faut utiliser comme point de référence sur l'axe des X? Pour des échantillons totaux de cellule, la voie la plus simple est d'utiliser certains polypeptides de PI connus (actine, tubuline, tropomyosine, vimentine et lactate déshydrogénase) et à partir de là, calculer la position d'une protéine inconnue en se référant à l'axe des X en fonction de sa distance par rapport à ces protéines standards (Bravo et al., 1981; Celis et Bravo, 1981 et Bravo et Celis, 1982).

Pour des échantillons inconnus, le problème peut être résolu en ajoutant des standards internes tels que des mélanges de protéines purifiées soigneusement choisies de PI connus (Comings et Peters, 1981).

L'utilisation du PM comme axe des Y est aussi fortement conseillé ; cependant, le PM apparent doit être considéré avec une certaine réserve car de nombreux polypeptides présentent un comportement anormal quand la concentration en bisacrylamide est modifiée. Un tel effet est présenté à la figure 1.17. : les polypeptides 1 et 2 ont un PM similaire à l' $\alpha$ -tubuline (55Kd) quand de faibles concentrations en bisacrylamide sont utilisées (fig 1.17 (a)). Si cette concentration augmente (fig 17 (b)), la différence de PM entre les deux polypeptides est de 5 Kd.

Enfin, notons que, si le pourcentage d'acrylamide varie alors que le rapport acrylamide/bisacrylamide est constant, le PM apparent de ces deux polypeptides reste inchangé.

### 7.3. Conclusion

La technique de l'électrophorèse en deux dimensions permet la détection directe d'un très grand nombre de protéines cellulaires, beaucoup d'entre elles n'ayant jamais pu être caractérisées jusqu'à présent. Bien que ce procédé ne peut être utilisé directement pour déterminer la fonction des protéines, il nous offre une vue générale de la réponse



biologique en termes de nombre et d'intensité des variations pour les différents polypeptides cellulaires.

L'électrophorèse en deux dimensions, une des techniques analytiques la plus sensible dans le domaine de la biologie moléculaire, en conjonction avec les techniques d'ADN recombinant, les technologies d'hybridation et de séquençage devrait fournir une opportunité unique pour l'analyse et la compréhension de la fonction de nombreuses protéines cellulaires.

Dès à présent, de nombreuses études et travaux qui ont été réalisés ces dernières années ont montré le vaste champ d'application de cette technique. Que ce soit dans des domaines aussi divers que la chimie clinique ou de la biologie moléculaire animale (erreurs congénitales du métabolisme, taux de mutation des lignées germinales humaines, néoplasie, erreurs de traduction au niveau des cellules humaines ou bactériennes,...) et végétale (étude de l'expression génique au cours du développement précoce de la plante), le procédé de l'électrophorèse en deux dimensions trouve une utilisation très large et est un outil de choix pour tout chercheur désireux d'en connaître d'avantage sur l'organisation et l'orchestration des systèmes biologiques vivants.

## **II. OBJECTIFS**

L'étude du vieillissement cellulaire et les effets de stress ont été réalisés par O. Toussaint en utilisant le critère morphologique pour analyser les passages des cellules entre les divers morphotypes.

Il était important de confirmer les données obtenues en utilisant une caractérisation biochimique des effets observés. Nous avons choisi la technique des gels en deux dimensions qui est un procédé permettant d'obtenir des cartes protéiques typiques du type cellulaire considéré. Ainsi, Francz et al. (1989) (pour les fibroblastes WI-38) et Bayreuther et al. (1988) (pour les fibroblastes HH-8) ont montré que les sept morphotypes analysés par cette technique présentaient des distributions protéiques différentes.

L'objectif du travail fut donc de d'abord déterminer, dans les fibroblastes WI-38 utilisés, quel était l'état d'expression des diverses protéines en fonction de l'âge de la culture, c'est-à-dire en fonction des proportions variables des divers types cellulaires.

Ensuite, nous avons mis au point des stress qui permettaient d'obtenir à partir d'une culture jeune une composition en morphotypes proche d'une culture vieille.

Nous avons alors comparé la distribution des protéines après les stress afin de déterminer si l'expression des protéines correspond bien aux changements des morphotypes, c'est-à-dire si les stress peuvent provoquer des modifications dans l'expression génétique semblable à un "vieillissement" normal.



### **III. MATERIELS ET METHODES**

#### **1. Cultures de fibroblastes**

##### **1.1. Les fibroblastes WI-38**

Les fibroblastes WI-38 sont des cellules embryonnaires de poumon humain. Ces cellules ont été mises en culture selon la procédure classique décrite par Hayflick (1965). Les fibroblastes proviennent de l'Américan Type Culture Collection (U.S.A).

##### **1.2. Décongélation et mise en culture**

Les cellules WI-38 sont conservées dans de l'azote liquide à  $-196^{\circ}\text{C}$ . Ce processus permet une conservation des cellules sans qu'il y ait modification du nombre de divisions possibles, après la décongélation.

Lors de la congélation, les cellules sont récoltées et remises en suspension dans 0,8 ml de milieu de culture contenant 20% de sérum et 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO, Merck, RFA), ce dernier étant utilisé comme agent cryoprotecteur. Elles sont alors transférées dans un cryotube. La température est abaissée de  $1^{\circ}\text{C}$  par minute jusque  $-40^{\circ}\text{C}$  puis rapidement jusque  $-100^{\circ}\text{C}$  dans un appareil à congélation (PTLD 75, L'air Liquide, France). Les cellules sont ensuite placées dans l'azote liquide.

La décongélation est une étape rapide qui doit se dérouler en moins de 60 secondes. C'est pourquoi, dès que le cryotube est oté de l'azote liquide, il est plongé dans un bain à  $40^{\circ}\text{C}$ . Celui-ci subit ensuite une centrifugation à 900 rpm pendant 10 minutes. Le milieu de congélation est alors décanté et les cellules sont reprises dans le milieu de culture additionné de 10% de sérum. Elles sont finalement placées dans une boîte de culture Cel Cult (Grande-Bretagne) de  $75\text{ cm}^2$ . Le lendemain, le milieu est renouvelé.

##### **1.3. Composition du milieu de culture**

Le milieu de culture utilisé pour les fibroblastes est le milieu de base de Eagle (= BME contenant 13 acides aminés, 8 vitamines et les sels de Earle) (Gibco, Grande-Bretagne).

Après dissolution du milieu, on ajoute  $2,2\text{ g/l}$  de  $\text{NaHCO}_3$  (Merck, Allemagne Fédérale) et on ajuste le pH à 7,15 avant la filtration. Le milieu est alors stérilisé sous pression

d'azote sur un appareil à filtration (Sartorius, RFA) (filtre 0,22  $\mu\text{m}$ ) préalablement autoclavé à 120°C pendant 20 minutes.

Avant utilisation de ce milieu, on y ajoute encore 10% de sérum de veau foetal (Gibco, Grande-Bretagne), ce qui confère à la culture les facteurs de croissance nécessaires.

#### 1.4. Méthode de culture des fibroblastes

Lorsque les cellules sont confluentes, on les détache du support à l'aide de 2 ml de trypsine 0,25% en solution saline tamponnée dans du tampon Tris (Gibco, Grande-Bretagne). Ensuite, on les resuspend dans un volume déterminé de milieu de culture en vue de les répartir dans d'autres boîtes de culture adéquates.

Les supports utilisés sont des boîtes de culture d'une surface de 75  $\text{cm}^2$  (Cel-Cult, Grande-Bretagne) et en présence d'une atmosphère contenant 5% de  $\text{CO}_2$  et à une température de 37°C.

### 2. Etude de l'effet de stress cellulaires multiples

En vue d'étudier l'effet "toxique" de divers stress sur les cellules, celles-ci sont repiquées non seulement dans des boîtes multi-compartmentées de 24 puits (Cel-Cult, Grande-Bretagne), mais aussi dans des boîtes de Pétri de 6 cm de diamètre (Falcon, USA) et sont incubées pendant 24 heures dans une étuve à 5% de  $\text{CO}_2$  et à 37°C.

Les stress sont réalisés en remplaçant le milieu de culture par une solution constituée de BME+10% de sérum contenant diverses concentrations en tert-butylhydroperoxyde (TBHP) (Aldrich-Chemical, Belgium) pendant 60 minutes.

Au terme de ces 60 minutes, les puits et/ou les boîtes de Pétri sont rincées avec du milieu BME sans sérum et du milieu de culture frais contenant 10% de sérum de veau foetal est fourni aux cellules.

### 3. Détermination des types morphologiques

Dans le but de déterminer les différents types morphologiques des cellules, celles-ci sont repiquées à faible densité, environ 700 cellules par  $\text{cm}^2$  ou 20.000 cellules par boîte, dans des boîtes de Pétri de 6 cm de diamètre (Falcon, USA) préalablement quadrillées à l'aide d'un diamant. Deux jours après le repiquage, ces cellules sont fixées dans une solution de paraformaldéhyde (Merck, Allemagne Fédérale) à 3,7% dans du



PBS (phosphate buffer saline). pendant une durée de 10 minutes après un double rinçage avec le PBS. Ensuite, les cellules sont mises en présence d'un mélange éthanol-eau distillée (7/3 v/v) pendant 10 minutes et séchées par la suite dans une étuve à 40°C.

La coloration des fibroblastes est réalisée au Bleu de Coomassie durant 30 secondes. Ce colorant est constitué comme suit : 50 mg du colorant (Janssen Biochimica, Belgique) sont dilués dans 4,7 ml d'acide acétique (Janssen Biochimica, Belgique), 22,7 ml d'éthanol (Merck, Allemagne Fédérale) et 22,7 ml d'eau.

On rince ensuite les boîtes à l'eau distillée et on les laisse à nouveau sécher à 40°C.

Les comptages des cellules des divers types morphologiques sont réalisés au microscope à contraste de phase.

#### 4. Stress multiples

Ceux-ci sont réalisés comme suit : le premier stress est appliqué sur les puits et/ou sur les boîtes de Pétri non confluentes. Après 60 minutes, le milieu servant au stress est décanté, les boîtes sont rincées avec du BME seul, puis il est remplacé par du milieu BME+S frais. Quarante-huit heures plus tard, les cellules sont à nouveau stressées et ainsi de suite.

Après chaque stress, une petite quantité des cellules survivantes est prélevée et répartie dans des boîtes de Pétri quadrillées selon le processus expliqué auparavant. Les cellules sont fixées le lendemain et colorées afin de déterminer le pourcentage des divers types morphologiques.

#### 5. Incorporation de la méthionine radioactive

Etant donné que l'analyse des protéines se fait par électrophorèse sur gel d'acrylamide révélé par autoradiographie, les cellules requièrent quelques manipulations supplémentaires. Le lendemain du stress, le milieu de culture est remplacé par du milieu ne contenant ni méthionine, ni glutamine (Gibco, Ecosse), additionné de sérum de veau foetal (10%). On laisse incuber pendant 5 minutes et au terme de ce délai, on ajoute 2 µl de méthionine marquée au <sup>35</sup>S.

Après 16 heures d'incubation, les cellules sont rincées 2 fois avec du PBS contenant de la méthionine froide à 0,02%. Elles sont ensuite lysées à l'aide de 200 µl de tampon de lyse dont la composition sera détaillée dans le paragraphe consacré aux gels en deux dimensions.

## 6. Electrophorèses à deux dimensions

Cette technique a été mise au point par O'Farrel (1975) et modifiée par Lecocq (non publié).

Au cours de la première dimension, on réalise une électrofocalisation (IEF) en présence d'urée et d'un détergent neutre. Par la suite, on réalise la seconde dimension, qui est une électrophorèse à l'aide de grands gels plats en condition dénaturantes par l'utilisation du SDS.

A présent, nous allons décrire la procédure à suivre pour la réalisation de ces électrophorèses.

### 6.1. Solutions pour la première dimension

Ces solutions sont similaires à celles décrites par O'Farrel (1975).

La plupart des produits utilisés ont été fournis par la firme Bio-rad (USA) et Gibco-BRL (Grande-Bretagne).

#### 6.1.1. Tampon de lyse :

Urée (9,5 M) : 22,8 g  
 Nonidet P40 (2% v/v) (Sigma) : 0,8 g  
 Servalyte 40% , pH7 (2,0%) (Serva) : 2 ml  
 Dithiothreitol (Sigma) : 616,0 mg  
 H<sub>2</sub>O : 20,4 ml

#### 6.1.2. Acrylamide solution IEF (D)

Acrylamide : 5,676 g  
 Bisacrylamide : 0,324 g  
 Porter à 20 ml avec H<sub>2</sub>O et ajouter du "Mixed Bed" (Ag 501-X8 Bio-rad) et agiter pendant vingt minutes avec un barreau magnétique.

#### 6.1.3. Solution NP40 (E)

Nonidet P40 (10% v/v) : 2,0 g  
 Porter à 20 ml avec H<sub>2</sub>O (agiter avec un barreau magnétique car la solution est très visqueuse.)



## 6.1.4. Solution de recouvrement du gel (H)

Urée : 4,8 g

Porter à 10 ml avec H<sub>2</sub>O.

## 6.1.5. Solution de recouvrement de l'échantillon (KBr)

Urée : 4,8 g

Servalyte 40%, pH7-9 : 50,0 ml

Nonidet P40 : 100,0 mg

β-mercaptoéthanol : 100,0 ml

H<sub>2</sub>O : 1,4 ml

## 6.1.6. SDS Sample buffer (O)

Glycérol 87% (Merck) : 50,0 g

βmercaptoéthanol : 25,0 ml

Dodécyl Sulfate de Sodium (SDS) : 10 g

Tris 0,15 M : 3,78 g

H<sub>2</sub>O : 400 ml

Ajuster à pH 6,8 par HCl à 25% (7,7 N).

Porter à 500 ml avec H<sub>2</sub>O.

6.1.7. Anolyte (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)

1,36 ml d'acide orthophosphorique à 85% (Merck) dans 2 litres d'eau.

## 6.1.8. Catholyte (NaOH)

24ml de NaOH 1N dans 580 ml d'eau.

Mettre sous vide pendant 30 minutes afin de dégazer la solution.

Les solutions III.6.1.1, III.6.1.4 et III.6.1.5 sont à conserver à 20°C.

Les autres solutions sont conservées à 4°C.

## 6.2. Solutions pour la seconde dimension

### 6.2.1. Gel à 10% d'acrylamide (volumes pour 1 gel)

SDS à 0,4% dans Tris 1,5 M pH 8,8 : 13,2 ml

Acrylamide/Bisacrylamide 30/0,8% dans H<sub>2</sub>O : 21,12 ml

H<sub>2</sub>O : 15,84 ml

TEMED : 52,8  $\mu$ l

Ammonium persulfate (APS) 1% dans H<sub>2</sub>O : 2,64 ml

### 6.2.2. Gel de concentration

SDS 0,4% dans Tris HCl 0,5 M pH 6,8 : 3,75 ml

Acrylamide/Bisacrylamide 30/0,8% dans H<sub>2</sub>O : 1,5 ml

H<sub>2</sub>O : 8,25 ml

TEMED : 15  $\mu$ l

APS 1% : 1,5 ml

### 6.2.3. Tampon d'électrophorèse

Pour 6 litres : Tris HCl 25mM : 18,18 g

Glycine 0,192M : 86,49 g

SDS 0,1% : 6,0 g

### 6.2.4. Solution de conservation des gels

H<sub>2</sub>O : 700 ml

Tris : 181,7 g

Ajuster à pH 8,8 par HCl 6N.

Porter à 1 litre avec H<sub>2</sub>O.

### 6.2.5. Solution d'agarose 1%

Agarose : 1,0 g

Bleu de bromophénol : 2,0 mg

H<sub>2</sub>O : 100 ml



### 6.3. Procédure pour la première dimension

Les ampholytes utilisés couvrent une zone de pH allant de 5,0 à 7,0 ; les ampholytes de pH 3,0 à 12,0 que l'on ajoute n'ont pour but que de stabiliser le gradient entre 5,0 et 7,0.

Notons que la présence d'urée rend la valeur de cette zone tout à fait théorique.

Les tubes en verre dans lesquels sont réalisés les gels de la première dimension ont un diamètre intérieur de 2 mm, leur longueur totale est de 15 cm. Un trait est tracé à 2 cm du haut. Après polymérisation, le gel s'étant contracté, la longueur réelle du gel est de 14,7 cm.

#### 6.3.1. Lavage des tubes

Vu qu'il est important d'éviter des traces d'ions et pour faciliter le démontage, il est nécessaire que les tubes soient propres. Pour ce faire, les tubes sont lavés avec du détergent "Bio rad" (20 ml/l) "overnight" à la température du laboratoire. Ils sont ensuite traités par de l'HCl 0,1N à ébullition pendant une heure. Après rinçage par de l'eau distillée et de l'acétone, ils sont séchés à l'air chaud (sèche-cheveux).

#### 6.3.2. Effilement des pipettes Pasteur

Celles-ci seront utilisées chaque fois qu'une solution doit être ajoutée ou ôtée du tube. Il est nécessaire de les effiler car le diamètre intérieur des tubes n'est que de 2 mm. On chauffe la pipette Pasteur au niveau de l'évasement avec un bec bunsen, quand le verre devient mou, on le tire régulièrement pour obtenir un étirement de 4 cm.

#### 6.3.3. Polymérisation de la première dimension

Les tubes sont fermés à l'extrémité opposée au trait par trois couches de "Parafilm". Ils sont ensuite posés verticalement sur un portoir.

SOLUTION (pour 6 gels IEF) :

Urée : 3,7 g

Acrylamide (D) : 0,9 ml

NP40 : 1,35 ml

H<sub>2</sub>O : 0,9 ml

Attendre que l'urée soit bien dissoute (ceci peut être accéléré en plaçant le berlin contenant la solution dans un bain marie à 37°C).

Traitement au "Mixed Bed" pendant 30 minutes.

Filtrer afin d'oter la résine.

Servalyte 5/7 : 270 ml

Biolyte 5/7 : 270 ml

Biolyte 3/10 : 135 ml

Ammonium persulfate (2%) : 39,5 ml

Dégazer toute la solution pendant 2 minutes car l'oxygène peut s'opposer à la polymérisation.

Temed : 4,5 ml

Les tubes sont remplis à l'aide d'une seringue de 2 ou 5 ml munie d'un fin cathéter. Le cathéter est introduit dans le tube jusqu'au contact du "Parafilm" et il est remonté au fur et à mesure que l'on injecte la solution.

Chaque tube est rempli jusqu'au trait (ainsi tous les gels possèdent la même hauteur). Ensuite, le portoir est frappé 2 ou 3 fois contre la table afin d'éliminer les bulles d'air éventuelles.

Les gels sont alors surmontés d'un peu de solution H en utilisant une pipette Pasteur effilée. La polymérisation a lieu après environ 30 minutes.

On attend alors 30 minutes supplémentaires puis on enlève la solution H et on la remplace par 20 ml de tampon de lyse surmonté de 10 ml d'eau. On attend alors 60 minutes avant de lancer la pré-focalisation.

#### 6.3.4. Pré-focalisation

Les tubes sont débarrassés soigneusement du "Parafilm" et le liquide au-dessus du gel est oté.

Après examination pour vérifier l'absence de bulles d'air éventuelles, ils sont introduits dans une chambre électrophorétique standard (Model 175 Tube-Cell, Biorad) pour première dimension à une hauteur telle que le sommet du gel soit 2 mm plus haut que le bouchon qui enserre les tubes. La cuve inférieure est remplie par de l'anolyte de manière à ce que les extrémités inférieures des tubes trempent d'environ 5 mm dans la solution.

Le réservoir supérieur, posant sur le réservoir inférieur, est tourné rapidement afin de chasser les bulles qui seraient emprisonnées à la base des tubes.

Le sommet du gel est alors recouvert à l'aide de 20 ml de LBr dans chaque tube et on remplit ensuite ceux-ci avec du catholyte NaOH.



La cuve du haut est enfin remplie par du catholyte (NaOH) jusqu'à 5 mm du haut et le couvercle est mis en place.

#### 6.3.5. Conditions de pré-focalisation

L'électrode positive est connectée au réservoir inférieur et l'électrode négative est connectée au réservoir supérieur.

Voltage : 200V pendant 15 minutes.

300V pendant 30 minutes.

400V pendant 30 minutes.

500V pendant 30 minutes.

#### 6.3.6. Focalisation isoélectrique

Après la pré-focalisation, la cuve supérieure est vidée du NaOH. Le liquide au sommet des gels est oté et ceux-ci sont rincés par du tampon de lyse et le reste du tampon de lyse est enlevé à l'aide de languettes de papier "Whatman".

C'est à ce niveau de la procédure que l'on dépose l'échantillon, soit environ 7 mg de protéines dans 20 ml de tampon de lyse, ce qui représente 500.000 cpm/gel pour les protéines marquées. La radioactivité des lysats cellulaires à analyser doit donc être préalablement déterminée. Cet échantillon est ensuite recouvert par 10 ml de solution KBr. Les tubes sont finalement remplis par du catholyte frais comme décrit précédemment.

La focalisation isoélectrique est lancée "overnight" à 500 Volts. Après 16 heures au moins, le voltage est augmenté pour atteindre 1000 Volts pendant 60 minutes.

#### 6.3.7. Equilibration de la première dimension pour la seconde dimension

Les tubes sont sortis de la cuve et le liquide de la partie supérieure est enlevé avec une pipette Pasteur. Afin d'extraire les gels hors des tubes, on injecte de l'eau autour du gel à l'aide d'une seringue. De nombreuses précautions doivent être prises afin de ne pas briser les gels. Les gels sont démoulés et déposés sur un morceau de "Parafilm". Ils sont ensuite transférés dans des boîtes de Pétri de 6 cm de diamètre contenant 6 ml de solution O.

L'équilibration se fait en agitant le gel pendant 30 minutes dans cette solution.

Ils sont alors congelés à -70°C.

#### 6.4. SDS-PAGE : Seconde dimension

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS se réalise dans l'appareil Bio-rad "Protean II". La longueur totale du gel est de 20 cm et sa largeur est de 16 cm. L'épaisseur du gel est de 1 mm.

##### 6.4.1. Lavage des plaques

Les plaques sont lavées soigneusement à l'aide d'un détergent dégraissant et ensuite rincées plusieurs fois à l'eau distillée et finalement plongées dans de l'éthanol technique afin de d'éliminer toutes traces de graisses qui pourraient affecter l'uniformité du gel. Elles sont séchées verticalement dans un portoir à la température du laboratoire. On peut également les sécher en les passant à l'acétone et en les essuyant ensuite convenablement à l'aide d'un papier.

##### 6.4.2. Montage des plaques

Une plaque rectangulaire en verre de 17x18 cm est assemblée avec une plaque biseautée ; le biseau étant orienté vers la première plaque. Ces deux plaques sont séparées par des spacers en PVC de 1 mm d'épaisseur, disposés aux extrémités latérales. Le tout est maintenu par des "clamps" fournis avec l'appareil.

Ensuite, les plaques montées sont placées sur un support de remplissage.

##### 6.4.3. Polymérisation du gel SDS

#### SOLUTIONS :

**Gel à 10% d'acrylamide** : pour un gel, il faut :

SDS 0,4% dans Tris 1,5M pH 8,8 : 13,2 ml

Acrylamide/Bisacrylamide 30/0,8% dans H<sub>2</sub>O : 21,12 ml

H<sub>2</sub>O : 22,5 ml

Temed : 52,8 ml

Laisser dégazer pendant quelques minutes.

APS 1% : 2,64 ml



**Gel de concentration** : pour un gel, il faut :

SDS 0,4% dans Tris HCl 0,5 M pH 6,8 : 3,75 ml

Acrylamide/Bisacrylamide 30/0,8% : 1,5 ml

H<sub>2</sub>O : 8,25 ml

Temed : 15 ml

Laisser dégazer pendant quelques minutes.

APS 1% : 1,5 ml

**Tampon d'électrophorèse à pH 8,2** :

Pour 6 litres : Tris 25mM : 18,18g

Glycine 0,192 M : 86,49g

SDS 0,1% : 6,0 g

#### 6.4.4. Fabrication des gels

**Gel de séparation** : Les gels sont coulés à l'aide d'une ampoule à pipeter surmontée d'une poire. Afin que le coulage du gel se fasse de manière plane et uniforme, il est conseillé de pencher légèrement le support contenant les plaques (du moins, au début, vers la droite). Lorsque la solution a atteint un niveau équivalent à la moitié de la plaque, on redresse le support et on continue à remplir jusqu'à ce que le liquide ait atteint le trait fait au marqueur.

Une fois coulés, les gels sont recouverts sans tarder par 5 ml d'isobutanol à l'aide d'une pipette Pasteur.

Les gels polymérisent après environ 30 minutes. On attend 30 minutes supplémentaires. Le butanol est alors enlevé et les gels sont rincés par de l'eau distillée puis à l'aide de la solution LS/4SDS (100 ml de solution LS + 300ml d'eau + 0,4g de SDS).

Si les gels ne sont pas utilisés immédiatement, la solution de LS/4SDS n'est pas ôtée. Ces gels peuvent être gardés en chambre froide pendant quinze jours.

**Gel de concentration** : L'excès de LS/4SDS est ôté tout d'abord par renversement de la cuve. Les dernières gouttes sont éliminées en gardant la cuve penchée latéralement et en absorbant le liquide avec un morceau de papier "Whatman" coupé en biais. La cuve est ensuite redressée et on remplit chaque plaque à l'aide de la solution en utilisant une ampoule à pipeter.

Une fois les gels coulés, on centre au milieu du gel un petit peigne en téflon ayant le même diamètre que les premières dimensions. Si une bulle s'est formée, il est nécessaire de lever le peigne avec une pince afin d'éliminer cette bulle.

Il est bon d'observer le niveau et de compenser avec de la solution tant que le gel n'est pas polymérisé et ceci même au début de la polymérisation en utilisant la solution qui ne l'est pas encore.

Le gel polymérise après environ 25 minutes et il faut attendre encore 15 minutes minimum.

#### 6.4.5. Dépôt de la première dimension sur la seconde dimension

Le peigne est enlevé juste avant le dépôt de la première dimension afin d'éviter que le gel ne sèche. On penche les appareils latéralement afin que l'acrylamide non polymérisé s'écoule et on élimine ce liquide avec une pipette Pasteur. Le reste du gel est séché à l'aide d'un papier "Whatman".

La solution d'agarose est alors placée dans un bain marie à 80°C (sous la hotte car elle contient du  $\beta$ -mercaptoéthanol). Une fois fondue, la solution est homogénéisée par deux ou trois succions avec une pipette Pasteur.

Pendant ce temps, les gels des premières dimensions sont dégelés et le tampon O éliminé. Ces gels sont ensuite déposés lentement au sommet des gels de la seconde dimension. Ils sont enfin recouverts complètement avec 540 ml d'agarose fondu. L'assemblage est transféré sur le corps central de refroidissement. On veillera cependant à orienter le gel de telle façon que le biseau soit tourné vers l'intérieur. Le tout est déposé dans la cuve d'électrophorèse où l'on a préalablement placé le tampon d'électrophorèse ("running buffer") de telle manière que le bas des gels soit immergé d'environ 2 mm. Ensuite, on remplit la cuve supérieure avec le même tampon d'électrophorèse.

On place le couvercle et on démarre l'électrophorèse avec le système de refroidissement réglé sur 10°C. Le courant est fixé de manière à ce qu'il y ait 17 mA par gel. On laisse migrer pendant 16 heures environ et on arrête l'électrophorèse quand le colorant atteint le bas des gels.

#### 6.4.6. Démontage des plaques

Le corps central supportant les plaques est vidé de l'eau de refroidissement et du "running buffer". Une plaque est désassemblée de l'appareil et les clamps sont enlevés. Le gel est ensuite transféré dans la solution adéquate pour réaliser une autoradiographie.



### 6.5. Traitement des gels pour l'autoradiographie

Après l'électrophorèse, les gels sont plongés dans un bain d'acide acétique 7% pendant 10 minutes, puis, dans trois bains successifs de DMSO (Diméthylsulfoxyde, Janssen Chemica, Belgique) 100% pendant 30 minutes pour chaque bain. Les gels sont laissés ensuite toute une nuit dans une solution de PPO à 30 % dans du DMSO. Le lendemain, les gels sont rincés à l'eau courante pendant une heure, séchés sous vide à 70°C entre deux feuilles de cellophane pendant quatre heures, puis une heure à température ambiante. Les gels sont alors placés dans des cassettes (Kodak X Omatic) en présence d'un ou deux films pour autoradiographie (Amersham, films MP). Les cassettes sont placées à - 70°C pendant 10 jours avant la révélation.

### 6.6. Révélation de film photo

#### SOLUTIONS :

Révéléateur (R) : Kodak D19 : 80 ml dans 200 ml d'eau.

Fixateur (F) : Hypam : 50 ml dans 200 ml d'eau.

Les solutions sont utilisées à 18°C. Plonger les films à révéler pendant 4 minutes dans le révélateur, puis les rincer à l'eau distillée 3-4 fois avant de les plonger pendant 4 minutes dans le fixateur. Enfin, les films photos sont abondamment rincés à l'eau et séchés à température ambiante.

### 6.7. Analyse des gels

Ceux-ci ont été analysés grâce à un système d'analyses de gels d'électrophorèse SUN SPAC Station 2, Visage 110, avec le programme "2D Electrophoresis".

## 7. Estimation de la synthèse totale des protéines

Ce test se base sur l'incorporation d'un acide aminé marqué pendant un temps déterminé.

### 7.1. Réactifs utilisés

(<sup>3</sup>H)-leucine à 1 mCi/ ml (Amersham, Belgique).

Ether (Janssen Chemica, Belgique).

Ethanol (Merck, RFA).

Acide trichloroacétique (TCA) (Merck, RFA).

Leucine (Merck, RFA).

## 7.2. Mode opératoire

Les fibroblastes repiqués à confluence dans des boîtes de Pétri (diamètre : 35 mm) sont rincées une fois à l'aide de BME sans leucine.

Pendant différents temps d'incubation (1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h), les fibroblastes sont couverts par 1 ml de BME sans leucine contenant 5 mCi/ ml de ( $^3\text{H}$ )-leucine. Au terme des incubations, on décante le surnageant et on lave deux fois avec du PBS froid ( $0^\circ\text{C}$ ) contenant de la leucine non marquée à la concentration de  $10^{-4}$  M. La fraction non protéique est solubilisée en incubant les cellules pendant deux heures à  $4^\circ\text{C}$  avec du TCA 10% contenant également de la leucine non marquée à la même concentration que dans le PBS. La ( $^3\text{H}$ )-leucine contenue dans les protéines se retrouve précipitée sous l'action du TCA.

Ensuite, on lave une fois avec du TCA 10% contenant de la leucine froide à  $10^{-4}\text{M}$  et deux fois avec un mélange éthanol-éther (3:1 v/v). Les boîtes sont séchées à l'air. Les protéines sont alors resolubilisées dans 1 ml de NaOH (1N) à  $37^\circ\text{C}$  pendant une nuit. On reprend 200  $\mu\text{l}$  de ces fractions solubilisées auxquels on ajoute 5 ml de liquide scintillant Aqualuma (Lumac, Landgraaf, Pays-Bas) et 200  $\mu\text{l}$  pour doser ultérieurement les protéines par la méthode de Folin. La radioactivité est comptée dans un compteur à scintillation pendant trois minutes (Beckam, LS 6000 IC).

## 8. Estimation de la dégradation totale des protéines

### 8.1. Réactifs utilisés

( $^3\text{H}$ )-leucine à 1 mCi/ml (Amersham, Belgique).

Ether (Janssen Chemica, Belgique).

Ethanol (Merck, RFA).

Acide trichloroacétique (TCA)(Merck, RFA).

Leucine (Merck, RFA).



## 8.2. Mode opératoire

Le BME+10% de sérum recouvrant les cellules repiquées dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre est décanté. Les cellules sont alors rincées une fois avec du BME sans leucine. Pendant un temps d'incubation de 24 heures, les fibroblastes sont recouverts par 1ml de BME sans leucine contenant 5 mCi/ml de ( $^3\text{H}$ )-leucine.

Au terme de ces 24 heures, on décante le surnageant et on prélève 200  $\mu\text{l}$  pour réaliser un comptage de la radioactivité.

Les cellules sont alors rincées à l'aide de 1ml de BME + leucine à  $10^{-4}\text{M}$  (sans sérum) et recouvertes de 1 ml de BME + leucine à  $10^{-4}\text{M}$  pendant les temps d'incubation suivants : 0h, 2h, 3h, 4h, 5h et 6h.

La boîte 0h est une boîte Témoin.

Au terme de chacune des incubations, on prélève 200  $\mu\text{l}$  de surnageant que l'on met dans 5 ml de liquide scintillant Aqualuma. La radioactivité est mesurée dans un compteur à scintillation pendant trois minutes. Les cellules sont ensuite rincées deux fois avec du PBS froid ( $0^\circ\text{C}$ ) contenant de la leucine non marquée à la concentration de  $10^{-4}\text{M}$ .

La fraction non protéique est solubilisée en incubant les cellules pendant deux heures à  $4^\circ\text{C}$  avec du TCA 10% contenant aussi de la leucine non marquée à la même concentration que dans le PBS. Ensuite, on lave une fois avec ce même TCA et deux fois avec un mélange éthanol-éther (3/1 vol/vol). Les boîtes sont séchées à l'air.

Les protéines précipitées sont alors resolubilisées dans 1 ml de NaOH (1N) à  $37^\circ\text{C}$  pendant une nuit. On reprend alors 200  $\mu\text{l}$  de ces fractions solubilisées auxquels on ajoute 5ml de liquide scintillant Aqualuma et également 200 $\mu\text{l}$  pour doser les protéines ultérieurement. La radioactivité est alors déterminée dans un compteur à scintillation pendant trois minutes.

## **IV. RESULTATS**

### **1. Introduction**

Dans l'introduction, nous avons repris le développement du modèle théorique du vieillissement cellulaire considérant l'évolution d'une cellule au cours du temps comme étant un passage par différents états stationnaires. Ce modèle théorique prévoit que d'état stationnaire en état stationnaire, la quantité d'énergie libre disponible va diminuer de sorte que le système cellulaire a de plus en plus difficile à maintenir son homéostasie cellulaire et finalement atteindre un seuil critique au-delà duquel toute survie est impossible.

Ensuite, nous avons expliqué pourquoi les fibroblastes WI-38 sont un bon modèle expérimental pour l'étude du vieillissement cellulaire *in vitro*. En effet, au cours de leur culture *in vitro*, les fibroblastes WI-38 passent successivement par sept morphotypes bien distincts, caractérisés biochimiquement et morphologiquement. Notons que ces sept morphotypes se retrouvent également représentés dans le vieillissement *in vivo* des fibroblastes humains. Nous avons considéré que ces sept morphotypes correspondent à des états stationnaires de fonctionnement de ces cellules c'est-à-dire correspondant à sept niveaux de production d'entropie et donc d'énergie disponible.

D'après le modèle théorique développé dans l'introduction, des cellules ayant subi un stress pourraient quitter leur état stationnaire pour en rechercher un nouveau. Cette hypothèse a été vérifiée après un stress sous tert-butylhydroperoxyde (TBHP), qui est un peroxyde organique, ou sous éthanol en montrant une évolution des divers morphotypes vers des proportions en morphotypes caractéristiques de cultures de cellules âgées.

Une autre prévision du modèle théorique est que, lorsque la cellule passe d'un état stationnaire à un autre, elle va s'adapter à ce nouvel état en réajustant et en réorganisant son génome c'est-à-dire en modifiant l'expression de certains gènes.

Lors du passage vers des cellules de type âgé par une transition naturelle ou sous l'effet de stress, on peut donc s'attendre à ce qu'il y ait toute une série de polypeptides protéiques qui soient induits alors que d'autres verraient leur synthèse déprimée ou réprimée.

Le but de ce mémoire était de mettre en évidence ces modifications d'expression de protéines associées aux stress en utilisant la technique des électrophorèses en deux dimensions. En effet, par l'utilisation d'un tel procédé, on obtient des cartes protéiques typiques des cellules considérées; ainsi, par comparaison des cartes de cellules de type



	Générations		
Morphotypes	26	34	46
I	13,0	3,2	1,0
II	75,0	61,2	46,4
III	12,0	33,4	48,1
IV	0	2,1	3,4
V	0	0,1	1,0
VI	0	0	0
VII	0	0	0

Tableau IV.1. Proportions des différents morphotypes I à VII (%) en fonction des passages en culture. Aucun type morphologique de types VI et VII n'a été mis en évidence.

jeune et de cellules de type âgé, la présence de certaines protéines induites par le vieillissement ou la disparition de certaines protéines réprimées au cours du vieillissement pourrait être mis en évidence. On pouvait alors vérifier que les stress qui accélèrent le passage d'un morphotype à l'autre induisent bien la même expression des gènes et donc la même traduction de protéines que le passage "naturel" obtenu par l'âge de la culture.

## 2. Détermination des proportions des divers types morphologiques en fonction des passages en culture.

Nous avons commencé ce travail par une confirmation de l'évolution des différents morphotypes au cours des passages qui a été décrite précédemment. Pour ce faire, nous avons déterminé les proportions des différents morphotypes pour des passages en culture plus tardifs : 26, 34 et 46.

Les cellules ont été repiquées en boîte de Pétri et, une fois à confluence, les cellules ont été repiquées à nouveau à forte dilution, puis elles ont été fixées. La proportion des différents types morphologiques a été déterminée et le tableau IV.1. présente l'évolution de ces divers morphotypes selon le passage pris en compte.

On constate que 75% des types I ont disparu lorsque l'on passe d'une population cellulaire de passage 26 à une population de passage 34 et que ce pourcentage s'élève à environ 92% lorsque l'on considère les derniers passages en culture (46). Quant à la proportion des morphotypes de type II, elle diminue de façon moins importante que pour les cellules de type I mais malgré tout importante en valeur absolue.

Une évolution opposée est observée pour les morphotypes III avec un accroissement de quatre fois au passage 46 par rapport au passage 26. Une augmentation des types IV et V est également visible mais leur nombre reste toujours faible.

## 3. Analyse des gels d'électrophorèse en deux dimensions

Ayant confirmé une différence au niveau des proportions des différents types morphologiques pour des cellules à des passages variables, nous avons réalisé les gels d'électrophorèse en deux dimensions pour chacune de ces générations suivant la méthode présentée dans les matériels et méthodes.



Coordonnées XY sur G46	n° tache sur G46	G 46	G 34	G 26
x=423 y=635	258	35417	absente	absente
x=555 y=663	314	33100	39324	33100
x=439 y=524	182	47281	54113	53327
x=499 y=430	53	97550	97203	absente
x=777 y=503	161	56149	57133	59150
x=783 y=585	287	40728	46434	absente
x=807 y=584	286	40837	41127	46729
x=279 y=533	174	46186	absente	absente
x=259 y=549	172	44302	absente	absente
x=255 y=884	362	28108	17750	absente
x=648 y=736	342	27071	29403	27912
x=324 y=716	327	28669	absente	absente
x=361 y=733	329	27321	absente	absente
x=445 y=640	303	34959	41111	37174
x=763 y=609	282	38211	44343	41958
x=779 y=611	288	38008	44198	42215
x=829 y=617	290	37406	absente	absente
x=791 y=614	289	37706	43764	41366

Tableau IV.2. Répertoire des peptides qui représentent des variations importantes dans la distribution protéique des cellules aux passages 26, 34 et 46. Ce répertoire a été réalisé à partir de la comparaison des gels 2D. Le tableau indique le PM calculé à partir de chacun des gels.

Une fois l'étape de révélation par autoradiographie terminée, les gels ont été analysés à l'aide du système SUN SPARC Station 2, Visage 110. Au cours de la première étape, les gels vont être tout d'abord scannés par une caméra et ensuite en jouant sur différents paramètres, on tente de repérer le plus grand nombre de taches possibles afin de couvrir ainsi l'ensemble des protéines présentes sur le gel. Ce travail effectué, la seconde étape consiste à quantifier les taches et à leur attribuer une intensité. Vient enfin la troisième étape qui consiste à la comparaison de deux gels entre eux; cependant, afin d'obtenir une superposition des gels qui nous permettra par la suite d'établir une correspondance entre deux protéines situées aux mêmes endroits sur deux gels différents, il subsiste encore un travail qui consiste en un système de triangulation permettant de réduire les écarts de taille qui peuvent exister entre deux gels différents. Le but de ce travail, une fois toutes les étapes terminées, est alors de déterminer quelles seraient les protéines qui seraient sujettes à des variations entre les deux gels que nous comparons. Pour réaliser cette opération, chaque portion de gel est comparée à la même portion sur le gel voisin et une fois que l'on a repéré à l'oeil nu une variation protéique, on peut se positionner, à l'aide d'un curseur, à l'endroit désiré sur la portion du gel définie au départ sur le premier gel et passer sur la portion correspondante de l'autre gel. C'est de cette façon que l'on peut vérifier si la variation observée sur un gel à l'oeil nu est bien correcte.

Notons également que chaque tache sur un gel possède des coordonnées X, Y (ce qui nous permet de la repérer) qui varient d'un gel à l'autre de quelques unités, étant donné qu'il est très difficile d'obtenir des gels parfaitement identiques. C'est pourquoi, lors de la présentation des résultats obtenus dans les tableaux IV.2. et IV.8, on ne s'étonnera pas de voir une protéine présenter des variations sensibles au niveau de son PM.

#### 4. Comparaison des cartes protéiques.

La majorité des cellules représentatives d'une population cellulaire de passage 26 étant principalement des cellules de type mitotique (MFII) tandis que la majorité des cellules d'une population cellulaire de passage 46 étant surtout un mélange de morphotypes II et III, on pouvait soupçonner que l'éventail des protéines synthétisées par des cellules de passage 26 différerait de celui exprimé par des cellules plus vieilles. En effet, sur respectivement 375, 343 et 313 taches repérées au niveau des cartes protéiques de cellules de passage 46, 34 et 26, nous avons pu mettre en évidence 17 variations polypeptidiques entre ces trois passages. Nous avons choisi de prendre la carte protéique des cellules de passage 46 comme référence pour cette expérience et les



n° tache dans G46	G 46	G 34	G 26
314	0,110	0,139	0,142
182	0,261	0,089	0,007
53	0,085	0,042	absente
161	1,165	1,183	0,003
287	0,135	0,020	absente
286	0,061	0,611	0,660
362	0,526	1,1641	absente
342	0,001	0,056	0,049
303	0,234	0,090	0,077
282	0,336	0,211	0,130
288	0,158	0,064	0,098
289	0,182	0,104	0,099
290	0,081	absente	absente
258	0,876	absente	absente
174	0,590	absente	absente
172	0,366	absente	absente
327	0,300	absente	absente
329	0,231	absente	absente

Tableau IV.3. Détermination du pourcentage de l'intégration de la densité optique (% IOD) pour chaque protéine. Le numéro de ces peptides correspond à celui du tableau IV.2.

suivantes : en effet, dans un premier temps, nous avons comparé les résultats obtenus pour les cellules de passage 46 à ceux obtenus pour des passages 34 et 26 et dans un second temps, nous avons comparé les résultats obtenus à passage 46 à ceux obtenus avec des cellules stressées. Nous présentons en annexe un listing regroupant toutes les taches repérées au passage 46 avec leurs coordonnées X,Y, leur IOD (intégration de la densité optique), le % IOD (pourcentage de l'intégration de la densité optique) et leur PM. Remarquons que nous n'avons pas le point isoélectrique des protéines car aucun standard n'a été réalisé au cours de la première dimension. Les protéines marquées d'une croix dans le listing sont celles pour lesquelles une variation a été mise en évidence.

Le tableau IV.2. présente les protéines pour lesquelles on peut observer une différence par comparaison des trois cartes protéiques entre elles.

De ce premier type d'analyse semblent se dégager déjà quelques conclusions. Premièrement, il existerait des protéines spécifiques d'un passage de cellules "vieilles" (passage 46) puisque ces protéines ne semblent se retrouver ni au niveau d'une génération "jeune" (passage 26) pas plus qu'au niveau d'une génération intermédiaire (par exemple : protéines 258, 174, 172, 290, 327 et 329). D'autre part, on constate qu'il y a des polypeptides qui seraient induits quand la cellule commence à vieillir. Par exemple les protéines 287, 53 et 362 sont présentes aux passages 46 et 34 mais absentes au passage 26.

Ces comparaisons de type qualitatif ayant été réalisées, il nous a semblé essentiel d'aborder le problème de manière plus quantitative en intégrant la densité optique (IOD) des taches présentes dans deux ou les trois gels. Dans les faits, nous avons calculé le pourcentage de l'intégration de la densité optique (% IOD) par rapport à la somme des taches. Ce pourcentage représente donc une valeur déterminant l'abondance d'un polypeptide par rapport à l'ensemble de toutes les protéines d'une carte protéique. Ce nombre est aussi le reflet du niveau de synthèse d'une protéine d'un gel à l'autre.

Les résultats obtenus sont repris dans le tableau IV.3. où le % IOD a été déterminé pour chaque protéine et comparé à la même tache présente sur un autre gel. On peut résumer les résultats obtenus par l'analyse qualitative et quantitative de la manière suivante en les classant en trois groupes suivant leur comportement.

#### 4.1. Protéines spécifiques d'un passage âgé

Cette appellation regroupe les protéines qui sont synthétisées par une population cellulaire "vieille" et que l'on ne retrouve ni au niveau d'un passage intermédiaire (ici 34), ni au niveau d'un passage jeune (ici 26). Dans le cas présent, ce sont les



polypeptides 258 (PM : 35417), 174 (PM : 46186), 172 (PM : 44302), 327 (PM : 28669), 329 (PM : 27321) et 290 (PM : 37406) que l'on ne retrouve pas dans les cartes protéiques des passages 26 et 34.

#### 4.2. Protéines dont la synthèse est induite dès les passages intermédiaires

Par l'analyse des % IOD, on constate qu'il existe des protéines pour lesquelles l'abondance en fonction des passages passe de valeurs très faibles pour les cellules jeunes, puis, au fur et à mesure que elles commencent à vieillir, l'abondance de ces protéines s'accroît. Nous pensons, dès lors, que de tels polypeptides seraient des marqueurs assez précoces du vieillissement de ces fibroblastes. Au sein de ce groupe, nous retrouvons deux types de protéines : d'une part, nous avons les protéines qui n'existent pas au niveau du passage 26 et qui apparaissent aux passages 34 et 46 comme c'est le cas ici des protéines 53 (PM : 97550), 287 (PM : 40728) et 362 (PM : 28108). D'autre part, il y a des protéines dont l'abondance est faible au passage 26 et qui s'accroît aux passages 34 et 46. Les protéines 182 (PM : 47281) et 161 (PM : 56149) appartiennent à cette catégorie.

On peut aussi signaler des protéines déjà présentes aux passages 26 et 34, mais dont la proportion devient plus importante au passage 46. Il s'agit des protéines : 303 (PM : 34959), 288 (PM : 38008), 282 (PM : 38211) et 289 (PM : 37706). On pourrait considérer que la synthèse de ces protéines s'accroît au cours des derniers passages bien qu'étant déjà présentes auparavant.

#### 4.3. Protéines dont la synthèse diminue quand la cellule aborde les derniers passages en culture

Sous cette appellation, nous regrouperons les protéines dont le niveau de synthèse est déprimé quand la cellule est en phase finale de vie. Citons ici, les protéines 314 (PM : 33100), 286 (40837) et 342 (PM : 27071).

### 5. Conclusions

Comme présenté dans la littérature (Bayreuther et al., 1988), le vieillissement des cellules en culture n'est pas seulement un phénomène observable au microscope optique par une modification morphologique des cellules mais est aussi une variation au niveau moléculaire de l'éventail protéique synthétisé. Dès lors, nous avons un argument

(a) TBHP  $2,5 \cdot 10^{-3}M$

Morphotypes	1° stress	2° stress	3° stress	4° stress	5° stress
I	0,8	0,4	0,7	1,4	0,7
II	82,3	77,3	55,2	28,9	18,3
III	16,6	18,5	32,9	51,1	60,2
IV	0,3	2,9	9,0	13,2	13,0
V	0	0,9	2,2	5,4	7,8

(b) TBHP  $5 \cdot 10^{-3}M$

Morphotypes	1° stress	2° stress	3° stress	4° stress	5° stress
I	0,3	0,2	0,9		0,9
II	80,3	80,7	64,4		29,8
III	16,9	15,9	28,6		60,7
IV	2,4	3,1	4,8		5,7
V	0,1	0,1	1,3		2,9

(c) Témoin

Morphotypes	Témoin non stressé
I	6,1
II	87,2
III	6,1
IV	0,6
V	0

Tableau IV.4. Evolution des types morphologiques (%) au cours de 5 stress successifs de 1 heure sous TBHP  $2,5 \cdot 10^{-3}M$  (a) et  $5 \cdot 10^{-3}M$  (b) ou sans TBHP (c). Les cellules de passage 31 ont été cultivées dans des boîtes multicompartimentées presque à confluence et les différents types morphologiques déterminés 3 jours après chaque stress. Aucun type morphologique de type VI et VII n'a été mis en évidence.



supplémentaire en faveur du modèle théorique qui préconise que le passage de la cellule d'un état stationnaire à un autre s'accompagne d'une réorganisation du génome en vue d'une adaptation à ce nouvel état. A cet état d'avancement du travail, nous avons, à notre disposition, un outil très performant en vue de tester l'effet de stress sous TBHP et sous éthanol afin d'examiner si ces agents permettront aussi de produire un éventail protéique typique des cellules, en phase finale de vie comme indiqué par l'examen des morphotypes.

#### 6. Recherche des conditions optimales de stress pour l'analyse des proportions des divers types morphologiques

Ayant mis en évidence des variations de natures polypeptidiques entre des populations cellulaires de passages 26, 34 et 46, il s'avérait nécessaire dans un second temps de déterminer les conditions expérimentales qui nous permettraient de mimer le vieillissement "naturel" sous l'effet de stress. Nous voulions trouver des conditions de stress permettant d'obtenir des proportions en différents types morphologiques similaires à celles d'une population cellulaire de passage 46.

Les agents stressants utilisés sont le TBHP et l'éthanol : les effets encourus sous l'action de ces deux molécules ont été décrits dans l'introduction. Les durées de stress (de une heure pour le TBHP et de deux heures pour l'éthanol) et la concentration ( $2,5 \cdot 10^{-3}$  M et  $5 \cdot 10^{-3}$  M pour le TBHP et 6%, 7% et 8% v:v pour l'éthanol) furent choisies de façon à éviter toute cytotoxicité.

Des cellules de passage 30 ou 31 furent donc repiquées dans des boîtes de Pétri ou dans des boîtes multi-compartmentées. Cinq stress successifs ont été réalisés à deux jours d'intervalle sur les mêmes cellules et au terme des différents stress, les boîtes ou les puits ont été repiqués en vue de réaliser la détermination des proportions des divers types morphologiques. Cette détermination a été effectuée sur deux boîtes par observation de 400 cellules par boîte.

##### 6.1. Cellules repiquées en boîtes multi-compartmentées et stressées sous TBHP $2,5 \cdot 10^{-3}$ M et $5 \cdot 10^{-3}$ M.

Le tableau IV.4. donne l'évolution des proportions des différents morphotypes obtenues après chaque stress pour des cellules de passage 31 repiquées en boîtes multi-compartmentées à une densité 1/2.

(a) TBHP  $2,5 \cdot 10^{-3}M$

Morphotypes	1° stress	2° stress	3° stress	4° stress	5° stress
I	1,2	0,8	0,6	1,6	0,5
II	80,2	47,7	22,7	25,2	20,3
III	16,3	42,2	66,6	68,4	70,6
IV	2,1	7,3	6,3	3,2	6,3
V	0,2	2,1	3,4	1,6	2,3

(b) TBHP  $5 \cdot 10^{-3}M$

Morphotypes	1° stress	2° stress	3° stress	4° stress	5° stress
I	1,1	1,3	1,0	0,9	1,1
II	78,9	56,5	29,8	24,0	20,1
III	17,4	37,9	64,3	69,4	71,8
IV	2,6	3,2	3,5	3,9	4,8
V	0	1,1	1,4	1,8	2,2

(c) Témoin

Morphotypes	Témoin non stressé
I	6,1
II	87,2
III	6,1
IV	0,6
V	0

Tableau IV.5. Evolution des types morphologiques (%) au cours de 5 stress successifs de 1 heure sous TBHP  $2,5 \cdot 10^{-3}M$  (a) et  $5 \cdot 10^{-3}M$  (b) ou sans TBHP (c). Les cellules de passage 31 ont été cultivées dans des boîtes de Pétri à une dilution de 2 fois et les différents types morphologiques déterminés 3 jours après chaque stress. Aucun type morphologique VI et VII n'a été mis en évidence.



Pour les stress sous TBHP  $2,5 \cdot 10^{-3}$  M, on constate que les proportions des morphotypes I demeurent très faibles dans tous les stress tandis que les types morphologiques II subissent une réduction progressive de leur population en fonction du nombre de stress avec 25% restant pour les derniers stress. En contre partie, les morphotypes III suivent une évolution opposée avec un accroissement qui peut atteindre 10 fois le nombre de morphotypes du témoin n'ayant subi aucun stress. Cette augmentation est applicable également aux morphotypes IV. Enfin, on constate une apparition des morphotypes V au terme du deuxième stress avec une proportion qui s'avère non négligeable après le cinquième stress puisqu'elle représente environ 7 à 8% du total.

Pour les stress réalisés sous TBHP  $5 \cdot 10^{-3}$  M, on observe aussi une diminution de la proportion des morphotypes II au profit des morphotypes III, IV et V. Cependant, on constate que le pourcentage des cellules post-mitotiques n'est pas aussi élevé que dans l'expérience précédente.

Notons enfin qu'au terme du cinquième stress, on retrouve des proportions similaires à celles obtenues sous TBHP  $2,5 \cdot 10^{-3}$  M.

## 6.2. Cellules repiquées en boîtes de Pétri et stressées sous TBHP $2,5 \cdot 10^{-3}$ M et $5 \cdot 10^{-3}$ M

Les résultats obtenus après comptage sont repris dans le tableau IV.5.

Les stress en boîte de Pétri sont réalisés sur des cellules de densité 1/4.

Tout comme pour les cellules repiquées dans des boîtes multi-compartmentées, on remarque que les cellules repiquées dans des boîtes de Pétri et stressées à deux jours d'intervalle en présence de TBHP  $2,5 \cdot 10^{-3}$  M voient ses morphotypes I et II diminuer dans des proportions semblables aux deux expériences précédentes, les mêmes conclusions pouvant être tirées pour les morphotypes III, IV et V, c'est-à-dire une évolution dans le sens d'un accroissement de leurs proportions après chaque stress.

Notons aussi que la diminution relative des morphotypes II est proche de 60% au terme du second stress. Ceci s'expliquerait par le fait que la confluence est différente dans l'un ou l'autre type de boîte de culture avec pour conséquence une variation des proportions des types cellulaires après un même nombre de stress.

Les deux stress produisent un accroissement des populations de cellules post-mitotiques qui représentent en moyenne près de 80% du total au terme du cinquième stress. En présence de TBHP  $5 \cdot 10^{-3}$  M, on observe cependant, une légère diminution des proportions des types IV et V qui sont éliminés par la trop forte cytotoxicité du TBHP.

a. ETHANOL 6 %

Morphotypes	1° stress	2° stress	3° stress	4° stress	5° stress
I	1,4	0,8	0,7	0,5	0,5
II	72,7	71,3	64,8	61,5	59,4
III	25,9	26,7	32,7	35,7	37,3
IV	0,5	0,6	1,0	1,3	1,5
V	0,5	0,6	0,8	1,0	1,3

b. ETHANOL 7 %

Morphotypes	1° stress	2° stress	3° stress	4° stress	5° stress
I	0,7	0,7	0,4	0,2	0,2
II	77,1	69,0	65,0	60,5	57,9
III	20,7	28,8	32,9	36,3	38,6
IV	1,0	1,0	1,1	1,5	1,8
V	0,5	0,5	0,6	1,5	1,5

c. ETHANOL 8 %

Morphotypes	1° stress	2° stress	3° stress	4° stress	5° stress
I	0,7	0,6	0,6	0,4	0,7
II	79,3	70,9	60,6	50,8	41,9
III	18,8	26,3	35,5	45,4	53,9
IV	0,9	1,4	2,3	2,4	2,5
V	0,3	0,8	1,0	1,0	1,0

d. CONTROLE

Morphotypes	T non str.
I	5.3%
II	88.7%
III	5.9%
IV	0.1%
V	0

Tableau IV.6. (a, b, c et d). Evolution des types morphologiques (%) au cours de 5 stress successifs de 1 heure sous éthanol 6% (a), 7% (b), 8% (c) et sans éthanol (d).

Les cellules de passage 31 ont été cultivées dans des boîtes multi-compartmentées à une dilution de 2 fois et les divers morphotypes déterminés 3 jours après chaque stress. Aucun morphotype de type VI et VII n'a été mis en évidence.



### 6.3. Evolution des proportions des types cellulaires après cinq stress successifs sous éthanol 6, 7 et 8%

Les stress ont été réalisés sur des cellules repiquées à une densité de 1/2.

#### 6.3.1. Evolution des proportions des morphotypes après cinq stress successifs sous éthanol 6%

Le tableau IV.6. (a) présente les résultats obtenus.

On constate que les types I ont pratiquement disparus et restent inférieurs à 1% dans les divers stress sauf au premier stress. Les types II diminuent d'environ 50% par rapport aux proportions du contrôle et ceci au profit des types III.

On voit aussi que la population des types IV et V s'accroît de 3 fois par rapport au contrôle.

#### 6.3.2. Evolution des proportions des morphotypes après cinq stress successifs sous éthanol 7%.

Le tableau IV.6. (b) présente les résultats obtenus.

On remarque que les valeurs obtenues sont très similaires à celles obtenues après les 5 stress sous éthanol 6% et donc, la même conclusion peut être faite à quelques nuances près, à savoir : une légère augmentation des types III, IV et V par rapport au stress à 6%.

#### 6.3.3. Evolution des proportions des morphotypes après cinq stress successifs sous éthanol 8%.

Le tableau IV.6. (c) présente les résultats obtenus.

Ici encore, l'évolution des divers types morphologiques suit le même chemin que précédemment, c'est-à-dire une diminution des types I et II au profit d'un accroissement des types III, IV et V. Cependant, notons que la diminution des types I et II s'est encore accentuée de même que l'accroissement des types III, IV et V.

On constate aussi que les proportions obtenues au terme du cinquième stress sont très proches à celles obtenues par les cellules de passage 46 utilisées pour l'analyse en gel en deux dimensions. C'est pourquoi, nous avons choisi cette concentration en éthanol et 5 stress successifs sur une culture de cellules jeunes pour réaliser les gels en deux dimensions.

### 7. Comparaison des cartes protéiques après les stress

Nous avons réalisé les cartes protéiques sur des cellules ayant subi deux types de stress : la première fut réalisée avec le lysat cellulaire provenant de cellules de passage 33 ayant subi cinq stress successifs avec une concentration de 8% en éthanol et la seconde migration fut réalisée avec le même lysat cellulaire ayant subi trois stress sous TBHP  $2,5 \cdot 10^{-3}$  M.

Parallèlement à la migration de ces deux lysats cellulaires, nous avons également confirmé les proportions des divers types morphologiques obtenues.

Le tableau IV.7. présente les résultats obtenus.

Type morphologique	TBHP 3 str	Eth 5 str
I	1,4 %	0,3 %
II	42,6 %	46,4 %
III	51,3 %	49,8 %
IV	2,8 %	2 %
V	1,8 %	1,5 %
VI	0 %	0 %
VII	0 %	0 %

On voit que les proportions des divers morphotypes obtenus après ces stress sont proches de celles trouvées dans le passage 46. Dès lors, on devrait théoriquement s'attendre à ce que les cartes protéiques issues des lysats cellulaires ayant subi respectivement 5 stress sous éthanol 8% (que nous appellerons désormais "Eth 5 str") et trois stress sous TBHP  $2,5 \cdot 10^{-3}$  M (que nous appellerons désormais "TBHP 3 str") aient une distribution protéique similaire à nos cellules de passage 46.

Pour rappel, une fois l'étape de révélation par l'autoradiographie terminée, nous avons analysé les cartes protéiques à l'aide du procédé VISAGE 110. Les diverses étapes décrites au point 3 ont été à nouveau suivies pour la comparaison de nos cartes protéiques (c'est-à-dire G46, TBHP 3 str et Eth 5 str), nous avons pris une fois encore la G46 comme référence puisque c'est elle qui nous sert de base pour vérifier ce que nous testons ici, à savoir : la mise en évidence de protéines communes entre des cartes protéiques provenant de cellule de passage "vieux" et celles correspondant aux cellules stressées sous éthanol et TBHP.



n° tache sur G46	G 46	ETH 5 str	TBHP 3 str
258	35417	36720	33260
314	33100	33100	30803
182	47281	47900	49449
53	97550	96550	76640
161	56149	59270	53998
290	37406	absente	absente
287	40728	absente	40212
286	40837	42920	39542
174	46186	57240	47468
172	44302	absente	absente
362	28108	19420	17750
342	27071	absente	absente
303	34959	absente	33260
282	38211	38550	36530
288	38008	38630	36530
289	37706	37780	35830
327	28669	absente	absente
329	27321	absente	absente

Tableau IV.8. Répertoire des peptides qui représentent des variations importantes dans la distribution protéique des cellules au passage 46 et après des stress successifs sous éthanol et TBHP réalisés respectivement à partir de cellules de passage 33. Ce répertoire a été réalisé à partir de la comparaison des gels 2D. Le tableau indique le PM calculé à partir de chacun des gels.

Nous avons donc repris les diverses données concernant les protéines de la G46 (coordonnées X,Y ; n° de la tache considérée ; PM, ...) et nous les avons comparées aux cartes de TBHP 3 str et Eth 5 str.

Comme précédemment nous avons tout d'abord repéré les protéines communes aux trois gels (passage 46, Eth 5str et TBHP 3str) et ensuite nous avons recherché le % IOD de ces même protéines.

### 7.1. Mise en évidence de polypeptides communs entre le passage 46, Eth 5 str et TBHP 3 str

#### 7.1.1. Détermination des PM

Les résultats sont repris dans le tableau IV.8.

Trois types de constatations peuvent être faites à partir de ces résultats:

1. Sur les six protéines typiques des cellules de passage 46, on en trouve deux (174 et 258) après les stress sous éthanol et TBHP. Ceci confirme bien que des protéines correspondant à des phénotypes âgés sont bien exprimées après le stress.
2. Certaines protéines (par exemple : les protéines 290, 172, 327 et 329) n'apparaissent pas sous l'effet des stress. Ceci peut s'expliquer soit par une inhibition de la synthèse de ces protéines lorsque les cellules sont mises en présence de telle ou telle molécule stressante, soit par une évolution nulle ou plus tardive des gènes responsables de leur synthèse.
3. Enfin, les agents stressants pourraient agir spécifiquement sur tel ou tel type de protéine puisque l'on a mis en évidence un polypeptide qui disparaît suite à un traitement à l'éthanol (exemple : protéine 287) mais qui ne paraît pas affecté par le TBHP

#### 7.1.2. Détermination des % IOD (voir tableau IV.9.)

L'abondance de certaines protéines se voit accrue ou diminuée lors du vieillissement "naturel" et l'est également après les stress, c'est le cas des protéines 286, 362 et 342 pour les stress au TBHP et à l'éthanol et 288 pour les stress à l'éthanol. Par contre, certaines protéines dont le % IOD augmente au cours du vieillissement connaissent soit un statu quo soit une faible diminution après les stress (protéines 182, 53, 161, 303, 282 et 289). La protéine 314, quant à elle, connaît une diminution de son % IOD après les stress, alors que cette valeur reste stationnaire au cours du vieillissement "naturel" (tableau IV.9.). La raison de cette différence quantitative n'est pas connue. S'agit-il d'une



n° tache sur G46	G 46	ETH 5 str	TBHP 3 str
258	0,876	0,047	0,056
314	0,110	0,071	0,064
182	0,261	0,098	0,071
53	0,085	0,037	0,066
161	1,165	0,417	0,169
290	0,081	absente	absente
287	0,135	absente	0,316
286	0,061	0,029	0,026
174	0,590	0,386	0,319
172	0,366	absente	absente
362	0,526	0,713	0,466
342	0,001	absente	absente
303	0,234	absente	0,056
282	0,336	0,08	0,069
288	0,158	0,142	0,037
289	0,182	0,013	0,078
327	0,300	absente	absente
329	0,231	absente	absente

Tableau IV.9. Détermination du pourcentage de l'intégration de la densité optique (% IOD) pour chaque protéine. Le numéro de ces peptides correspond à celui du tableau IV.8.

synthèse non encore à son optimum puisque mesurée trois jours après le stress ou un effet sur leur dégradation?

Afin d'illustrer notre travail, des photos de gels en deux dimensions après révélation par autographie (photo 1), puis quantification par le système Visage 110 (photo 2) et enfin après comparaison des gels entre eux (photo 3) sont présentées aux pages suivantes.

## 7.2. Conclusions

L'analyse des résultats obtenus permet de montrer la présence après les stress de protéines typiques de passage 46, c'est-à-dire correspondant à des morphotypes plus âgés, ceci étant un argument confirmant les résultats obtenus sur les morphotypes à savoir la possibilité d'"accélérer" le vieillissement des cellules sous l'effet de stress plus ou moins intenses et reproduire ainsi le phénomène de senescence "naturelle" des cellules.

Ainsi, lorsqu'une cellule serait soumise à des conditions plus ou moins stressantes, elle effectuerait un passage plus ou moins important à travers les divers états stationnaires qui lui sont offerts afin d'acquérir une nouvelle stabilité. Ce passage plus ou moins rapide s'accompagnerait non seulement, d'une modification de l'aspect morphologique général de la cellule, mais aussi d'une expression et/ou d'une induction spécifique de certaines protéines qui constitueraient au niveau moléculaire les marqueurs "phénotypiques" d'un vieillissement prématuré des cellules. Cette affirmation n'est cependant pas absolue et sera nuancée dans la discussion.

Une autre prévision du modèle théorique est qu'au cours du vieillissement, les cellules disposent de moins en moins d'énergie et utilisent de plus en plus mal cette énergie libre disponible pour réaliser leurs diverses fonctions et notamment pour lutter contre les agressions du milieu environnant et ainsi y faire face.

Or, lors de certains stress, il y aura possibilité d'altération d'un certain nombre de protéines que la cellule devra dégrader d'une part et qu'il faudra remplacer d'autre part.

C'est cette prévision que nous avons testée dans la suite du travail.

## 8. Estimation de la synthèse totale et de la dégradation totale des protéines en conditions normales ou après un stress

Une estimation de la mortalité cellulaire après les stress que nous avons appliqués sur les cultures cellulaires montre que la quantité totale de protéines reste constante. Cette quantité reflète la quantité de cellules présentes : celle-ci ne varie pas après les stress que nous avons



Photo 1 : Photo d'un gel d'électrophorèse en deux dimensions de passage 46 avant l'étape de quantification des taches, prise à l'écran du système d'analyse des gels en deux dimensions Visage 110.

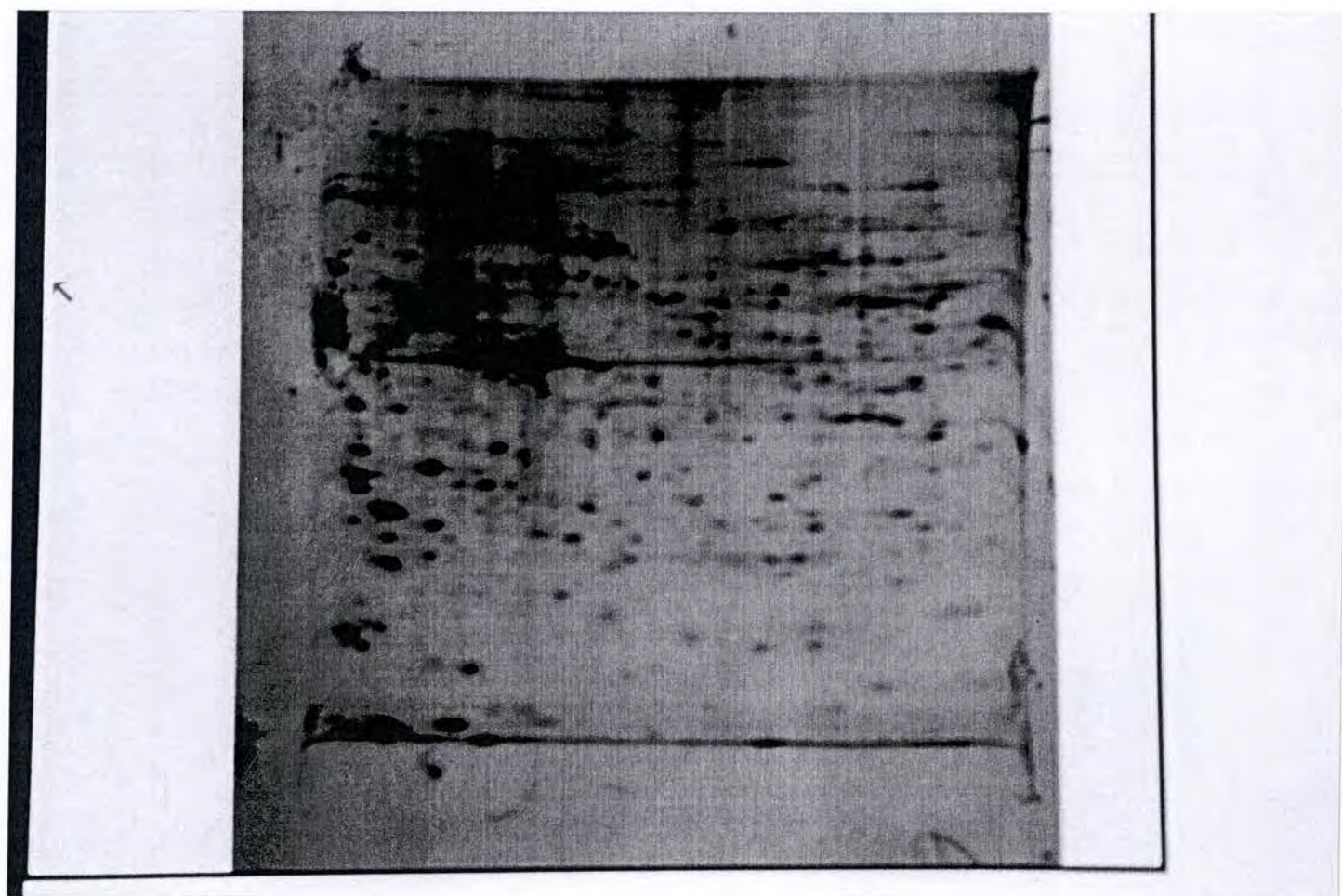




Photo 2 : Photo d'un gel d'électrophorèse en deux dimensions de passage 46 après l'étape de quantification des taches, prise à l'écran du système d'analyse des gels en deux dimensions Visage 110.

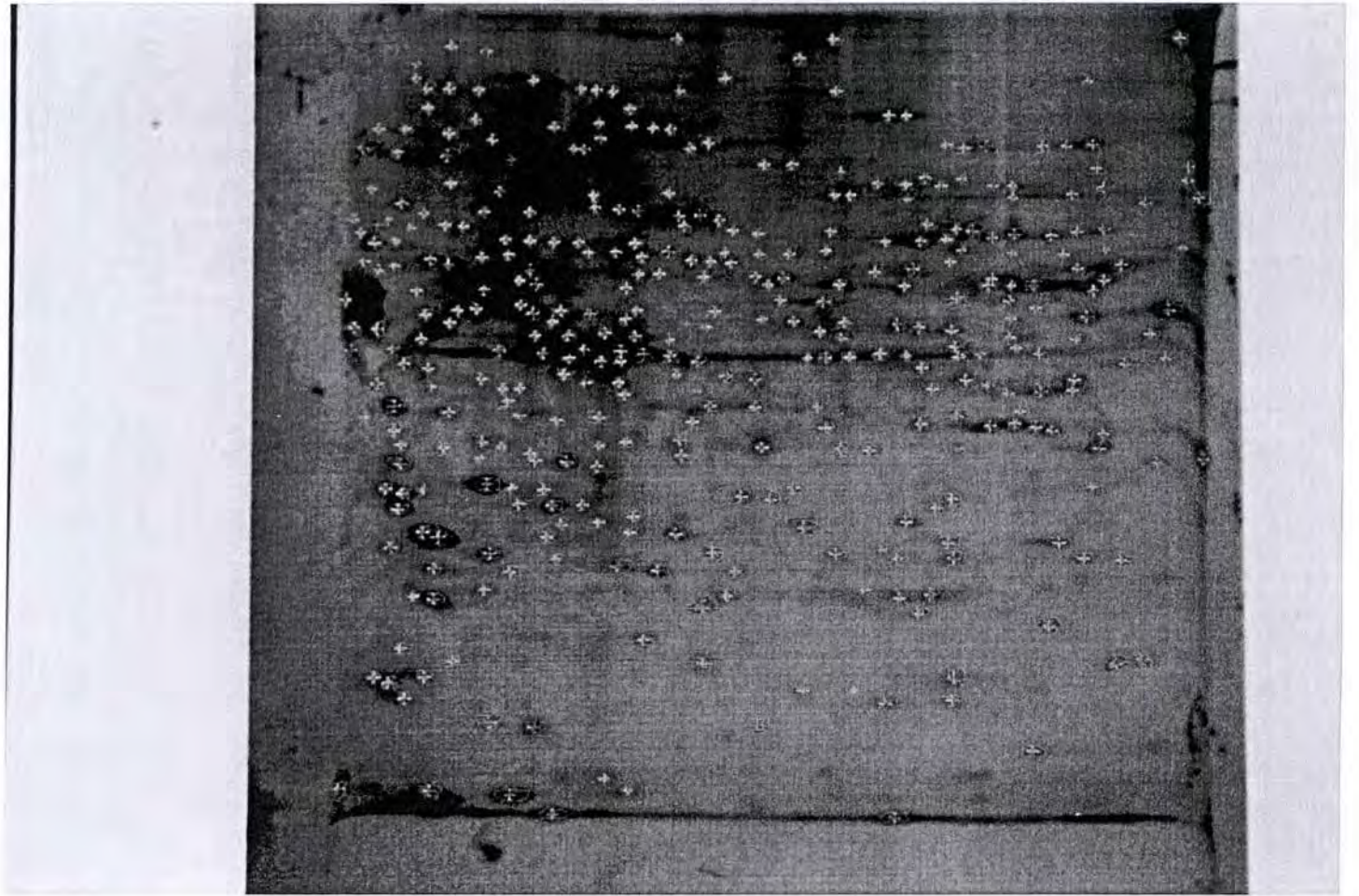
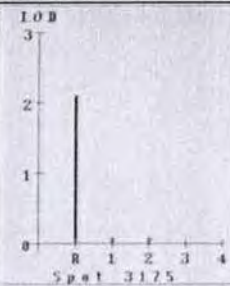
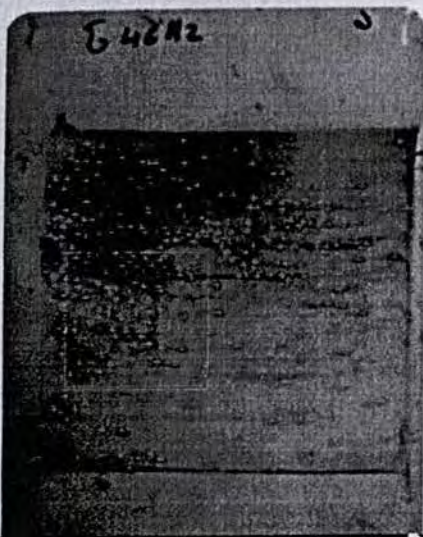




Photo 3 : Photo de la tache n°258 présente sur les gels d'électrophorèse de passage 46 et des cellules stressées mais absente sur les gels d'électrophorèse des cellules de passage 34 et 26, prise à l'écran du système d'analyse des gels en deux dimensions Visage 110.

En haut, à droite : Graphe comparant le pourcentage de l'intégration de la densité optique pour la tache 258 présente sur les gels G46, Eth 5str et TbhP 3str.

INVESTIGATOR: tst\_c46M2 x-906 y-1013 dv-158



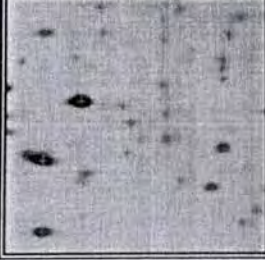
tst\_stI



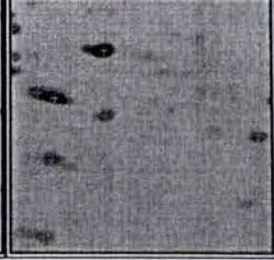
tst\_stresseII1811



tst\_c26M1



tst\_c34M1





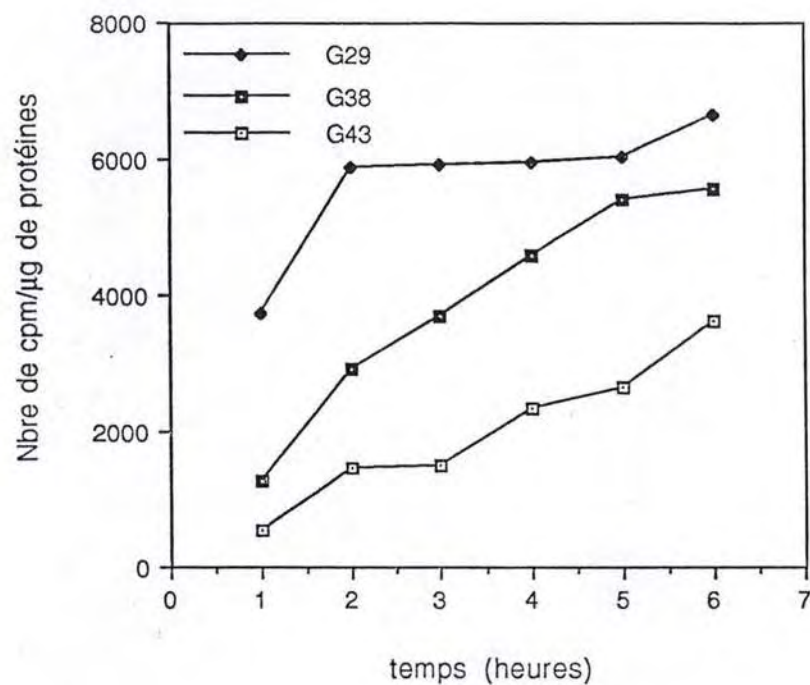


Fig IV.1. Estimation de la synthèse totale de protéines (cpm/μg de protéines cellulaires ) au cours du temps (heures) pour des cellules de passage 29, 38 et 43.

réalisés, confirmant ainsi leur faible cytotoxicité. Bien que la plupart des cellules restent en vie après un stress, il n'est pas certain que la capacité des cellules à dégrader les protéines endommagées et à en synthétiser de nouvelles ne soit pas altérée au cours du vieillissement. La théorie prévoit qu'au cours du vieillissement, la cellule passe par divers états stationnaires et qu'au cours de ces passages, elle dispose de moins en moins d'énergie libre pour effectuer les fonctions cellulaires, notamment éliminer les composés cellulaires altérés et les remplacer par d'autres.

C'est cette hypothèse que nous avons testée au cours des études réalisées ci-dessous. Nous avons réalisé un stress de 60 min sous TBHP  $5 \cdot 10^{-3}$  M réalisé dans du BME + S sur des populations cellulaires jeunes ou âgées. Par la suite, nous avons estimé la synthèse totale des protéines et la dégradation totale des protéines en suivant le modèle expérimental expliqué dans les matériels et méthodes.

Dans un premier temps, nous avons estimé la synthèse et la dégradation sur des populations cellulaires de passages différents. Notons que ces cellules avaient évolué vers le type âgé selon un processus "naturel" de vieillissement, c'est-à-dire sans qu'aucun stress n'ait été appliqué sur les cellules.

#### 8.1. Estimation de la synthèse totale des protéines chez des cellules de divers passages

Lors de ces expériences, nous avons tout d'abord estimé la quantité de protéines mesurées par la méthode de dosage au Folin. Ceci nous a permis de calculer le nombre de mg de protéines/boîte de Pétri. Parallèlement, nous avons déterminé dans un compteur à scintillation, le nombre de cpm/boîte de Pétri, mesure qui nous donne une estimation de l'incorporation de la leucine- $(^3\text{H})$  dans les protéines au cours du temps.

En faisant le rapport de ces deux valeurs, on obtient un nombre de cpm/mg de protéines.

Les résultats obtenus sont présentés à la figure IV.1. où l'estimation de la synthèse totale des protéines pendant des temps allant de une heure à six heures a été réalisée pour des cellules de passages 29, 38 et 43.

On constate que comme prévu, les cellules de passage âgé possèdent une capacité moindre à synthétiser leurs protéines. Pour les temps de 1 et 2 heures, on remarque que l'incorporation de la leucine radioactive au niveau des protéines est trois à cinq fois plus élevée pour les cellules de passage 29 que pour les cellules de type vieux. Notons que pour les temps 4h, 5h et 6h, cette augmentation est un peu moindre du fait du plateau obtenu dans les cellules jeunes. On peut donc conclure que la vitesse d'incorporation de la leucine- $(^3\text{H})$  au niveau de leurs



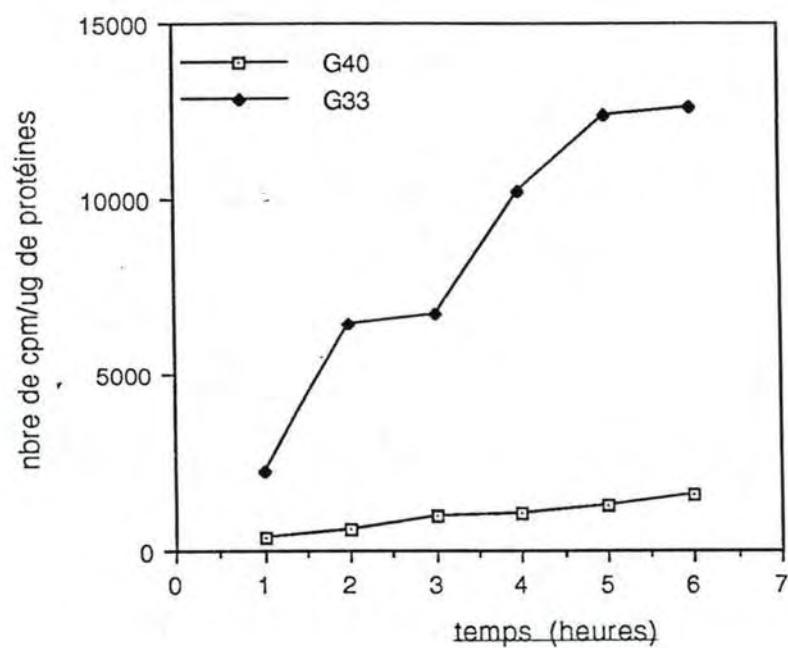


Fig IV.2. Estimation de la synthèse totale des protéines (nombre de cpm/mg de protéines) au cours du temps (heures) après une heure de stress sous TBHP  $5 \cdot 10^{-3}$  M pour des cellules de passage 33 et 40.

protéines serait moins rapide, signifiant un renouvellement plus lent des autres protéines chez les cellules vieilles.

En ce qui concerne le passage intermédiaire, on constate qu'elles commencent peu à peu à exprimer les "stigmates" de la sénescence cellulaire puisqu'elles n'incorporent déjà plus aussi bien la leucine au niveau des polypeptides néosynthétisés.

## 8.2. Estimation de la synthèse totale des protéines après une heure de stress sous TBHP $5 \cdot 10^{-3}$ M

Nous nous sommes alors posé la question de savoir comment ces même cellules réagiraient face à un stress. Les cellules "agressées" par le milieu environnant devraient réagir en exprimant certains gènes afin de faire face aux agents destructeurs, ceci devrait se traduire au niveau de la synthèse protéique.

Nous avons donc soumis dans un second temps nos cellules à un stress et mesuré l'incorporation de leucine tritiée. Les cellules choisies étaient des cellules provenant de passage 33 et de passage 40. Par l'analyse des résultats présentés à la fig IV.2., nous avons cherché à comprendre ce qui se passait.

Tout d'abord, intéressons-nous aux cellules de passage 33. Que constatons-nous? On remarque que l'incorporation de la leucine- $(^3\text{H})$  est accrue par rapport au contrôle et que cet accroissement est double au niveau du point 6 heures. Ceci semble donc confirmer ce que nous pensions : le stress a induit une réaction des cellules qui ont accentué la synthèse de leurs protéines (certaines de celles-ci ayant pu être endommagées), et ainsi faire face à l'agent toxique.

Ensuite, si on observe ce qui se passe pour des cellules de passage 40, on voit que l'incorporation de la leucine- $(^3\text{H})$  au cours du temps se fait de façon pratiquement constante mais, dans ce cas, les valeurs obtenues sont largement inférieures au contrôle.

Ainsi, il semblerait que des cellules de vieille génération ne s'avéraient plus capables de réagir au stress de manière à contrecarrer l'effet toxique de celui-ci. Bien au contraire, leur capacité de synthèse des protéines semble encore plus altérée que le contrôle.

## 8.3. Estimation de la dégradation totale des protéines pour des cellules de passage 28, 38 et 43

Afin d'estimer la dégradation des protéines, la mesure du relargage de la leucine tritiée a été suivie après son incorporation dans les protéines. Deux types de présentation des résultats ont été réalisés : le premier type représente le nombre de cpm relargués dans le surnageant



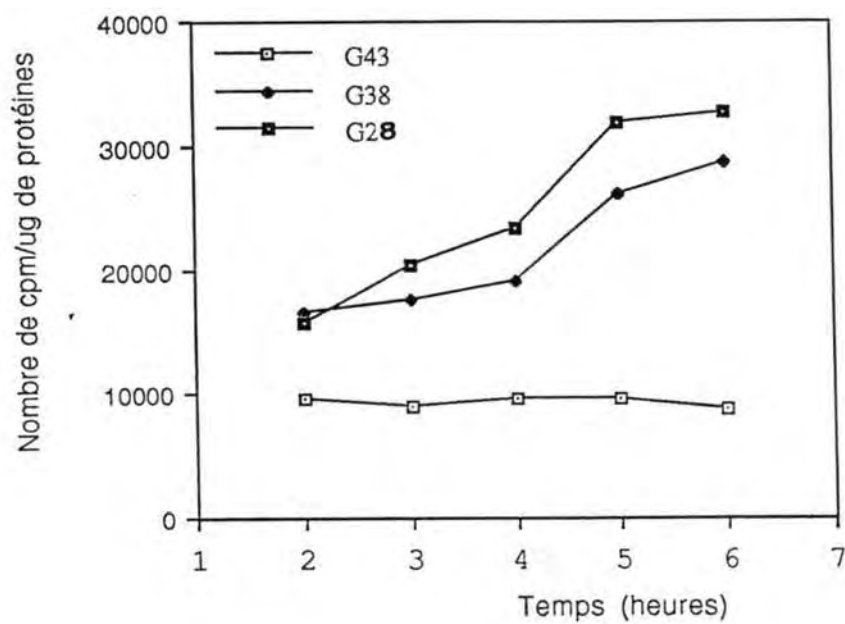


Fig IV.3. Estimation de la dégradation totale de protéines pour des cellules de passage 28, 38 et 43. Graphique du nombre de cpm du surnageant en fonction du temps (heures).

BME pendant des temps de 2h, 3h, 4h, 5h et 6h (ce milieu remplaçant au terme des 24 heures le milieu contenant la leucine-( $^3\text{H}$ )).

Le second type de graphe représente le nombre de cpm/mg de protéines que l'on retrouve dans la culot après 2h, 3h, 4h, 5h et 6h.

La fig IV.3. constitue le premier type de graphe. En observant l'allure des courbes, on constate que le relarguage est de moins en moins intense au fur et à mesure que l'on évolue vers des populations cellulaires de type avancé pour lesquelles ce relarguage, schématisé par la droite, augmente peu au cours du temps, à l'inverse des générations 28 et 38 pour lesquelles la présence de leucine-( $^3\text{H}$ ) dans le surnageant, augmente de manière croissante en fonction du temps.

En ce qui concerne la fig IV.4. qui constitue le second type de graphe, on voit que les courbes possèdent une allure décroissante qui témoigne d'une diminution de la leucine-( $^3\text{H}$ ) au niveau des protéines cellulaires. Ceci s'explique très aisément. En effet, nous avons affaire ici à une dégradation et donc les cellules, après avoir incorporé la leucine-( $^3\text{H}$ ) pendant 24 heures au niveau de leurs protéines, vont dans un second temps, dégrader une partie de ces protéines (turn-over), ce qui se traduira par une diminution de la quantité de leucine-( $^3\text{H}$ ) retrouvée au niveau des polypeptides et son augmentation concomitante au niveau du milieu BME sans sérum que l'on met à la place du milieu radioactif après les 24 heures d'incubation.

A présent, si on compare les différentes générations entre elles, on constate que la capacité de dégradation des cellules de passage 28 est plus rapide que pour les cellules de passage 38 et beaucoup plus importante que pour les vieilles cellules. De telles cellules pourront donc lutter plus efficacement contre les stress de natures diverses non seulement en synthétisant les protéines qui auraient été détruites (comme nous l'avons vu précédemment), mais aussi en dégradant les protéines altérées pour éviter ainsi qu'elles ne s'accumulent.

#### 8.4. Estimation de la dégradation totale des protéines après une heure de stress sous TBHP $5 \cdot 10^{-3}$ M

Afin de déterminer quelle serait l'influence du stress sur la dégradation, nous avons, au terme des 24 heures d'incubation avec la leucine-( $^3\text{H}$ ), soumis des cellules de passage 34 et 41 à une heure de stress sous TBHP  $5 \cdot 10^{-3}$  M dans du BME+S. Au terme des soixante minutes, nous avons, comme déjà fait précédemment, remplacé le milieu de stress par du milieu BME sans sérum.

Nous avons tout d'abord un premier type de graphe (fig IV.5), qui représente le nombre de cpm relargués au niveau du surnageant pendant les temps 2h, 3h, 4h, 5h et 6h. L'allure des deux courbes nous suggère un accroissement de ce nombre de cpm au niveau du surnageant BME;



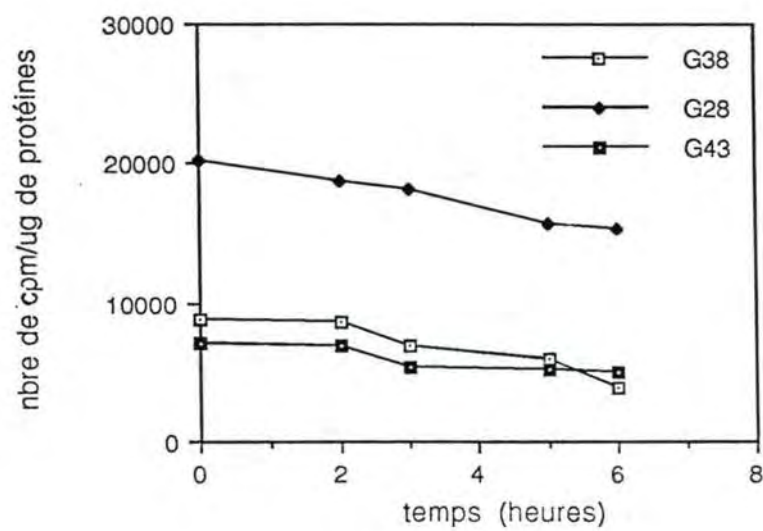


Fig IV.4. Estimation de la dégradation totale de protéines (nombre de cpm/ $\mu$ g de protéines) au cours du temps (heures) pour des cellules de passage 28, 38 et 43.

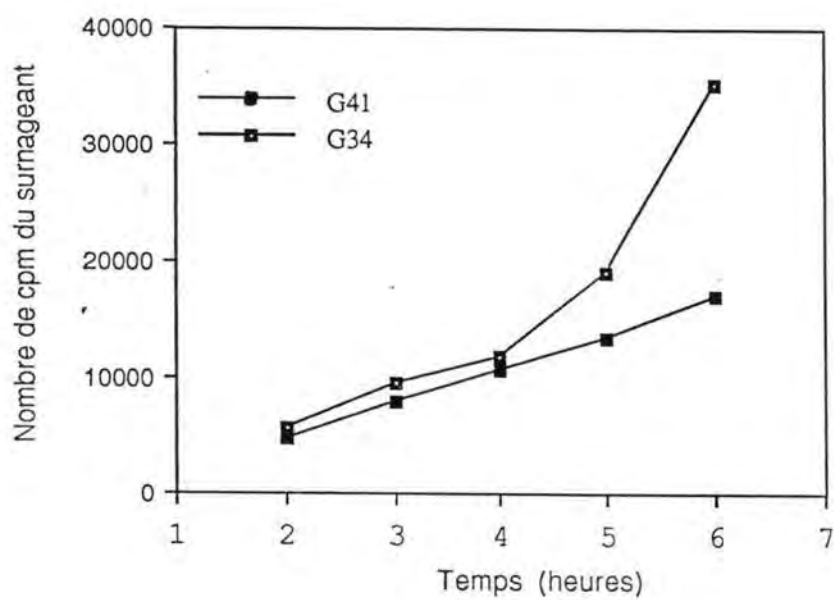


Fig IV.5. Estimation de la dégradation totale de protéines au cours du temps (heures) après une heure de stress sous TBHP  $5 \cdot 10^{-3}$  M pour des cellules de passage 34 et 41. Graphique du nombre de cpm du surnageant en fonction du temps.



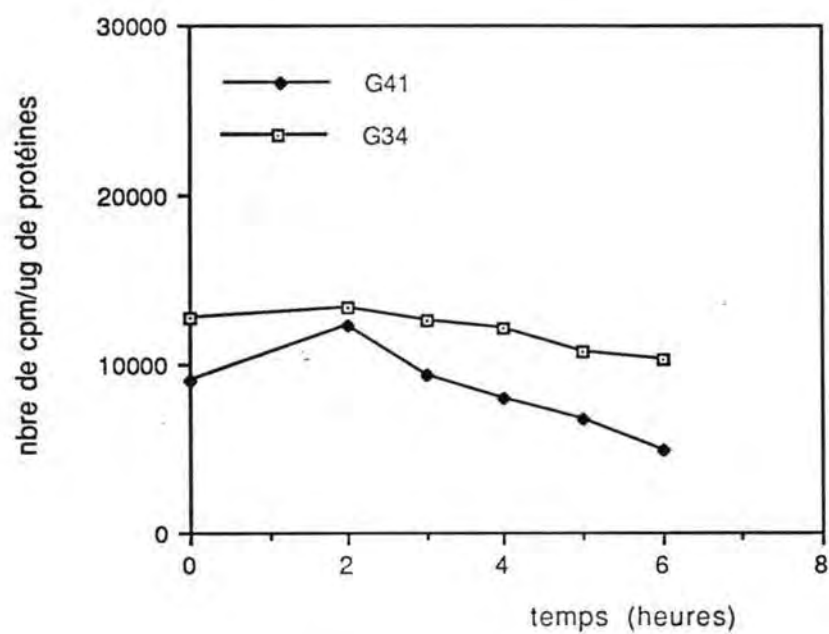


Fig.IV.6. Estimation de la dégradation totale des protéines (nombre de cpm/ $\mu$ g de protéines) au cours du temps (heures) après une heure de stress sous TBHP  $5 \cdot 10^{-3}$  M pour des cellules de passage 34 et 41.

cependant, on ne peut pas affirmer qu'il y ait un effet important à ce niveau qui serait induit par le stress, bien que l'on observe une légère augmentation par rapport au contrôle. Par contre, l'allure de la courbe est différente des cellules non stressées puisque le relargage de leucine est faible pendant les 4 premières heures puis augmente fortement.

Nous avons représenté à la figure IV.6. le nombre de cpm/ $\mu$ g de protéines au cours du temps. On ne peut pas mettre en évidence un effet notoire du stress sur la dégradation aussi bien pour les cellules de passage 34 que 41. D'autres expériences seraient donc utiles afin de confirmer ou d'infirmier ce résultat.



## V. DISCUSSION ET CONCLUSION

Dans l'introduction de ce travail, nous avons présenté un modèle théorique décrivant les différents aspects du vieillissement cellulaire en choisissant de modéliser l'évolution de la production d'entropie d'un système biologique au cours du temps en utilisant les acquis de la thermodynamique des systèmes ouverts loin de l'équilibre. Selon ce modèle, les systèmes ouverts loin de l'équilibre que sont les cellules, vivent à un certain niveau de production d'entropie. Mais contrairement aux systèmes ouverts proches de l'équilibre, l'état stationnaire de production d'entropie de la cellule peut être déstabilisé lors de certaines perturbations. La cellule tombera alors dans un nouvel état stationnaire. Si elle le trouve, alors elle survivra aux perturbations. Sinon un seuil critique d'accumulation d'erreurs dues aux fluctuations d'origine interne ou extérieure au système cellulaire, est dépassé et la cellule s'en va irrémédiablement vers la mort. Si la cellule survit, son nouvel état stationnaire sera caractérisé par un niveau basal de production d'entropie plus faible et donc par un moindre fonctionnement de son métabolisme général.

Ce modèle prédit le passage graduel de la cellule par différents états stationnaires de production d'entropie au cours de sa phase de vie pour atteindre finalement le seuil critique d'accumulation d'erreurs qui constitue le point de non retour de la cellule au-delà duquel la cellule dégénère et meurt. La théorie prévoit aussi que ce passage graduel peut se faire sous l'influence de deux facteurs : le génome, facteur totalement déterministe et l'altération moléculaire, pour sa part stochastique (Toussaint et al., 1991).

En plus de cet aspect théorique, nous avons démontré les points forts de l'utilisation des fibroblastes WI-38 comme modèle expérimental de base pour l'étude du vieillissement *in vitro*. En effet, au cours de leur culture *in vivo*, les fibroblastes de différentes souches, dont les WI-38, passent par sept étapes successives et bien distinctes caractérisées biochimiquement et morphologiquement (Francz et al., 1989). Notons également que ces différentes étapes se retrouvent au niveau du vieillissement *in vivo* des fibroblastes humains (Bayreuther et al., 1988). En fait, ces sept états morphologiques représentent chacun l'état stationnaire donné. Les cellules seraient suffisamment stables à l'état donné que pour être reconnues non seulement morphologiquement mais aussi au niveau de leur composition protéinique sur des gels en deux dimensions.

Morphologiquement, les sept types de fibroblastes peuvent se subdiviser en deux groupes : d'une part, les premiers types sont mitotiques et sont appelés MF (mitotic fibroblasts) I, II et III. Les trois suivants sont post-mitotiques et sont appelés PMF (post-mitotic fibroblasts) IV, V et VI. Enfin, le dernier type (PMF VII) est constitué de



cellules post-mitotiques en dégénérescence et qui meurent. En ce qui concerne leurs proportions au cours des passages en culture, on a montré (Toussaint et al., 1992a) que les cellules de type I qui sont abondantes lors des premiers passages, diminuent en nombre assez rapidement. La proportion des types II augmente un peu et puis diminue en faveur des cellules de type III et finalement des cellules de type post-mitotique (IV, V, VI et VII) sont observées en faibles proportions aux cours des derniers passages. Cette évolution "naturelle" à travers différents stades a été longuement considérée comme un argument en faveur des théories déterministes du vieillissement cellulaire (Bayreuther et al., 1988, 1990, Rodemann et al., 1989) et donc l'évolution proviendrait de modifications programmées dans la régulation de l'expression génique.

Cependant, d'après ce modèle théorique, le génome ne serait pas le seul guide lors de cette évolution qui pourrait dépendre d'autres facteurs eux-mêmes dépendant de la prise en compte du système cellulaire dans sa globalité. En effet, selon cette théorie un stress pour autant qu'il altère suffisamment le fonctionnement ou la structure cellulaire, déstabilisera l'état stationnaire sur lequel se trouve la cellule.

Néanmoins, l'interprétation génétique et déterministe semble trop restrictive, car il est difficile de penser qu'une même modification de l'expression génétique puisse avoir lieu après chaque stress. Ainsi, la durée de vie limitée des cellules en culture ne serait pas seulement déterminée par l'expression des gènes mais peut-être également modulée par des stress d'origine extracellulaire, et l'évolution du génome ne serait qu'une conséquence de la réorganisation globale du système cellulaire.

Et donc, cela signifie que si l'on fait subir des stress intenses mais non létaux à des cellules sur un état stationnaire donné, celles-ci subiront une déstabilisation de leur état stationnaire de production d'entropie et passera à un stade ultérieur de son évolution naturelle, ce qui provoquera son vieillissement.

Cette hypothèse a été vérifiée après des stress sous TBHP, un peroxyde organique ou sous éthanol en montrant qu'après un stress intense sur des cultures de cellules jeunes, les proportions des divers morphotypes évoluent vers des valeurs typiques de cultures de cellules âgées (Toussaint et al., 1992a).

Le but de ce mémoire, a été de mettre en évidence l'aspect biochimique du vieillissement cellulaire par la technique des gels en deux dimensions. Cette technique permet en effet, d'obtenir des cartes protéiques du type cellulaire considéré. Ainsi, comme l'ont montré Francz et al. (pour les fibroblastes HH-8, 1989) et Bayreuther et al. (pour les fibroblastes WI-38, 1988), chacun des sept types morphologiques présente une distribution caractéristique. Nous nous sommes donc attaché dans un premier temps à déterminer des proportions des divers morphotypes aux cours de différents passages en



culture et par la suite, à caractériser quel était l'éventail protéique synthétisé par ces cellules en fonction de leur âge par la mise en évidence de la présence ou de l'absence de certaines protéines entre les diverses cartes protéiques. Pour les protéines communes aux divers passages, nous nous sommes intéressé premièrement à l'apparition de protéines au cours des passages en culture et deuxièmement à leur abondance en fonction de l'âge de la culture.

Dans un second temps, nous avons recherché quelles étaient les conditions optimales de stress (au point de vue de leur nombre et de la concentration en agent stressant) afin qu'à partir d'une population cellulaire de passage jeune, on puisse retrouver les proportions obtenues par les cellules vieilles ayant évolué selon un processus naturel. La suite du travail a été, alors, de comparer les cartes protéiques de cellules de passage âgé (provenant de culture n'ayant subi aucun stress) aux cartes protéiques provenant de cellules stressées afin de tenter de mettre en évidence si une similarité entre ces deux aspects du vieillissement pouvait être observée au niveau biochimique en montrant que les stress pouvaient induire des protéines semblables à celles retrouvées au niveau d'un vieillissement "naturel".

Enfin, puisque le modèle théorique prévoit une diminution de la quantité d'énergie disponible de la cellule nécessaire pour effectuer certaines fonctions cellulaires au cours des passages en culture, on s'est intéressé à la capacité de synthèse et de dégradation des cellules en fonction de leur passage en culture.

La première conclusion de notre travail est que l'étude de l'aspect biochimique du vieillissement cellulaire par la technique des gels d'électrophorèse en deux dimensions peut être un argument en faveur du modèle théorique qui prévoit une réorganisation et un réajustement de l'expression génique lorsque le système passe d'un état stationnaire à un autre. Au cours de nos expériences, nous avons en effet tout d'abord montré une évolution des proportions des morphotypes vers les types III, IV et V, lorsqu'on s'avancait vers les derniers passages en culture, et ensuite, pour confirmer cet aspect morphologique du vieillissement, nous avons comparé les cartes protéiques de ces différents passages. Comparaisons qui ont alors confirmé que le vieillissement cellulaire était non seulement un phénomène observable au microscope optique par une modification drastique de l'aspect des cellules mais également un phénomène qui se caractérisait par l'apparition et/ou la disparition de protéines. Nous avons également mis en évidence le fait que le vieillissement n'était pas seulement caractérisé par la présence ou non de certains polypeptides, mais était aussi un processus dans lequel le niveau de synthèse de certaines protéines pouvait varier selon l'état de "jeunesse" de la culture.



La seconde conclusion nous permet de considérer un autre aspect du modèle théorique qui est la possibilité que nous avons d'accélération du vieillissement sous l'effet de stress uniques ou répétés. En effet, lors de tels stress, la cellule passera plus ou moins vite par les différents états stationnaires qui lui sont offerts acquérant ainsi plus rapidement les caractéristiques morphologiques et biochimiques propres aux cultures de passage âgé. De ces expériences ressort la mise en évidence de l'existence d'un éventail protéique commun entre des cellules d'un passage "âgé" n'ayant subi aucun stress et des cellules ayant subi plusieurs stress successifs.

Néanmoins, si certaines protéines apparaissent de la même manière lors du vieillissement "naturel" et lors des stress, ceci n'est pas une règle absolue. En effet, il n'y a pas toujours de modification dans la présence ou l'abondance de certaines protéines après les stress.

En conclusion, trois jours après une série de plusieurs stress qui modifient les proportions des différents morphotypes observés en microscopie en faveur des morphotypes âgés, on note aussi une réorganisation partielle de l'expression du génome. Cette réorganisation est partielle puisque l'on ne retrouve pas l'expression de toutes les protéines spécifiques du passage tardif (46) après les stress.

Comment interpréter cette réorganisation partielle? Plusieurs hypothèses sont plausibles. La première est que, trois jours après le dernier stress, certains ARNm spécifiques des morphotypes jeunes soient toujours présents et traduits en protéines. Il serait donc intéressant de reproduire ces expériences, mais cette fois en lysant les cellules stressées des temps plus longs après les stress de manière à attendre que ces ARNm hypothétiques soient détruits.

La seconde hypothèse est que la réorganisation de l'expression du génome après des stress successifs ne se fait pas à la même vitesse pour tous les gènes : certains gènes verraient leur expression directement modifiée après les stress et cela de façon similaire au processus de vieillissement naturel, alors que d'autres gènes verraient leur expression modifiée dans un délai plus long. Cette seconde interprétation serait très intéressante dans la mesure où la modification tardive de l'expression de certains gènes serait la conséquence de la modification plus précoce de l'expression d'autres gènes qui seraient les premiers touchés par ce processus de réorganisation générale. Cette interprétation rentre très bien dans le modèle théorique, puisque, suite à la déstabilisation d'un état stationnaire sous l'effet des stress ou du vieillissement normal, laquelle s'accompagne directement de la modification irréversible de l'expression de certains gènes, il faut s'attendre à ce que la cellule réajuste l'expression d'autres gènes de manière contrôlée dans le but de se maintenir à son nouvel état stationnaire.



Plusieurs questions pourraient émerger de cette interprétation. Premièrement, quelle est la nature des gènes dont l'expression est modifiée en premier lieu lors de l'effet des stress successifs? La connaissance de la nature de ces gènes permettront peut-être d'expliquer leur rôle dans la réorganisation globale qui a lieu. Cependant, il est aussi possible que la modification de l'expression de ces gènes soit la conséquence d'une réorganisation globale tout à fait stochastique de l'ADN et de la chromatine à un niveau de complexité plus élevé, ce qui pourrait expliquer que la cellule réagit par la suite de manière à maintenir un nouvel état stationnaire dépendant de cette réorganisation stochastique. De plus, il ne serait pas étonnant que, suite à cette réorganisation globale qui a lieu toujours de la même manière, l'expression de certains autres gènes se ferait de manière plus ou moins spécifique à l'intensité du stress. Par ailleurs, une réorganisation globale de la structure et des relations entre l'ADN et la chromatine pourraient expliquer un changement dans les propriétés morphologiques de la cellule. En effet, on sait que la structure d'une cellule doit être considérée comme un tout et que la modification des relations structurelles entre les macromolécules intranucléaires pourrait avoir des conséquences sur la morphologie des cellules via les membranes nucléaires, puis le cytosquelette. Inversement, on sait que des changements de nature physique du support sur lequel les cellules sont cultivées peuvent avoir un effet sur leur expression génétique; ce qui confirme bien la possibilité d'interaction entre la surface cellulaire et le génome (Maciera-Coelho, 1991).

En conclusion, si la cellule ne subit aucun stress intense tout au long de sa vie, son passage par les divers états stationnaires se fera de manière graduelle mais non rapide, elle cherchera toujours à optimiser son fonctionnement selon son état de différenciation et ses interactions avec son environnement. Elle finira néanmoins par atteindre le seuil critique d'accumulation d'erreurs au-delà duquel elle mourra.

Au contraire, si, à un moment de sa vie, elle subit l'effet de stress plus ou moins intenses (lors de processus pathologiques, par exemple), sa "descente aux enfers" sera accélérée et accompagnée d'une augmentation du niveau intracellulaire d'erreurs à laquelle la cellule tentera de réagir par une réorganisation globale de l'expression du génome.

La troisième et dernière conclusion de ce mémoire concerne l'estimation des capacités de synthèse et de dégradation des cellules au cours des divers passages en culture mais également après un stress unique. Les résultats des expériences ont montré une diminution de la capacité des cellules à synthétiser des protéines au fur et à mesure que la cellule abordait les derniers passages en culture; ce résultat appuie le modèle théorique qui stipule que la cellule lors de son passage par les états stationnaires va disposer de moins en moins d'énergie pour réaliser ses différentes fonctions et notamment la synthèse

de ses protéines, cellule qui finalement mourra puisqu'elle ne pourra plus entre autres remplacer les protéines qui auraient été endommagées lors du vieillissement.

L'effet d'un stress unique sur les capacités de synthèse des protéines fournit également de nombreuses informations quant à la potentialité de réaction des cellules face à une perturbation. En effet, les cellules jeunes seraient capables de faire face au stress par un accroissement de la synthèse des protéines et ainsi contrecarrer l'aspect nuisible et destructeur du stress. Tout au contraire, les cellules âgées stressées montrent une capacité de synthèse bien plus altérée qu'en absence de stress. Ce phénomène s'explique aisément grâce au modèle théorique. D'après le modèle thermodynamique des systèmes ouverts, un système cellulaire de passage "vieux" se trouve déjà sur un état stationnaire caractérisé par un niveau de production d'entropie très bas. Si de surcroît, on applique un stress à un tel système, il va de nouveau passer à un autre état stationnaire caractérisé par un niveau d'erreurs plus élevé et une production d'entropie encore plus faible. Le système se trouve alors devant une situation pour laquelle il a dû mal à réagir : sa potentialité à synthétiser de nouvelles protéines est de plus en plus faible, donc, les protéines altérées par le stress ne seront plus dégradées, ni remplacées par d'autres.

Les résultats obtenus par l'estimation de la synthèse totale des protéines vont également dans le sens du modèle théorique, à savoir une altération de la capacité des cellules à dégrader leurs protéines endommagées et cela au cours des divers passages en culture. Ainsi, un système cellulaire se trouvant sur un des derniers états stationnaires caractérisé par un niveau d'erreurs élevé et un niveau de production d'entropie très faible, se trouve face à une impasse : il est "envahi" par un très grand nombre de protéines fonctionnellement et structurellement altérées qu'il devrait en toute logique dégrader pour éviter qu'elles ne s'accumulent; cependant, il n'a plus assez d'énergie pour les remplacer par d'autres puisque comme nous l'avons vu, ses capacités de synthèse sont pratiquement nulles. Dès lors, le système cellulaire, en l'absence de ses freins qui lui permettaient jusque là de retarder l'avancement vers le point de non retour, s'avance inopinément vers la mort. Quant aux résultats obtenus qui permettaient d'évaluer les capacités de dégradation par ces cellules après un stress unique, nous resterons prudents vu que l'effet observé n'était que très léger. Ce n'est donc que par la mise au point d'expériences futures que nous pourrions confirmer les suspicions faites au cours de ce mémoire.

En conclusion, cette approche concernant l'étude du vieillissement cellulaire au niveau biochimique par l'utilisation des gels en deux dimensions est un argument en faveur du point de vue du vieillissement des cellules comme étant un processus en plusieurs étapes qui peut être accéléré suite à toute une série de perturbations



environnementales et qui est caractérisé par des réorganisations et des réajustements du génome à chaque fois que le système passe d'un état stationnaire à un autre.

Dans l'avenir, il serait intéressant de pouvoir déterminer quelles sont les protéines typiques des divers morphotypes cellulaires, ce qui permettrait sans aucun doute de mieux comprendre certains aspects moléculaires du vieillissement cellulaire et de tenter de déterminer et de comprendre quels seraient les mécanismes de régulation impliqués.

Mais nous pensons qu'une des perspectives les plus riches, serait de pouvoir déterminer du fait de la présence de telle ou telle protéine spécifique sur une carte protéique, à quel passage en culture nous avons affaire. En d'autres mots, devenir capables de dire l'âge des cellules comme on détermine l'âge d'un arbre au nombre de cernes que l'on observe sur le bois...

## VI. BIBLIOGRAPHIE

Adickes, E.A., Molinar, T.J. et Lockwood S.K. "Ethanol induced morphologic alterations during growth and maturation of cardiac myocytes". *Alcoholism : Clinical and Experimental research*, 14 ( 1990), 827-831.

Barnes, Y., Houser, S. et Barile, F.A. "Temporal effects of ethanol on growth, thymidine uptake, protein and collagen production in human foetal lung fibroblasts". *Toxic. in vitro*, 4 (1990), 1-7.

Bayreuther, K., Rodemann, H.P., Francz, P.I. et Maier, K. "Differentiation of fibroblasts stem cells". *J. Cell. Sci. Suppl*, 10 (1989), 1-15.

Bayreuther, K., Rodemann, H.P., Francz, P.I. et Maier, K. "Differentiation of fibroblast stem cells". *Journal Cell Sci suppl* 10 (1989), 115-130.

Beier, W. "Order, entropy and aging. A comment on the thermodynamics of irreversible processes". Robert, L. et Hofecker, G. (eds). *The theoretical basis of aging research*, (1990), pp 9-16.

Bellamy, D. "Degenerative diseases of ageing as problems of natural selection". *Gerontology*, 34 (1988), 315-326.

Bensaude, O., Babinet, C., Morange, M. et Jacob, A.F. "Heat shock proteins, first major products of zygotic gene activity in mouse embryo". *Letters to Nature*, 305 (1983), 331-333.

Babloyantz, A. "Molecules, dynamics and life". In: Prigogine, I. et Nicolis, G. (eds.) *Nonequilibrium problems in the physical science and biology: An introduction to self-organisation of matter*, vol.4 Wiley Interscience, New-York (1986).

Bortz, W.M. "Aging as entropy". *Experimental Gerontology*, 21 (1986), 321-328.



Bravo, R. et Knowland, J.S. "Classes of proteins synthesized in oocytes, eggs, embryos, and differentiated tissues of *Xenopus laevis*". *Differentiation*, 13 (1979), 101-108.

Bravo, R., Bellatin, J. et Celis, J.E. "<sup>35</sup>S)-methionine labeled polypeptides from HeLa cells. Coordinates and percentages of some polypeptides". *Cell Biol. Int. Rep.*, 5 (1981), 93-96.

Bravo, R. et Celis, J.E. "Up-dated catalogue of HeLa cell proteins : Percentages and characteristics of the major cell polypeptides labeled with a mixture of 16 (<sup>14</sup>C)-labeled amino acids". *Clin. Chem.*, 28 (1982), 766-781.

Brouwer, A., Seifert, W.F., Bosma, A., Van Leeuwen, R.E.W., Hendriks, H.F.J. et Knook, D.L. "Effect of long-term ethanol administration on survival and age-related pathophysiological changes in calorie restricted rats". 8th Wiener Symposium on Experimental Gerontology. Dans : Ruiz-Torres, A. et Hofecker, G. (Eds). "Modification of the rate of aging", 197-205.

Bruce, S.A. "Ultrastructure of dermal fibroblasts during development and aging : relationship to in vitro senescence of dermal fibroblasts". *Experimental Gerontology*, 26 (1991), 3-16.

Bruce, S.A. et Deamond, S.F. "Longitudinal study of in vivo wound repair and in vitro cellular senescence of dermal fibroblasts". *Experimental Gerontology*, 26 (1991), 17-27.

Bull, H.B., Breese, K., Ferguson, G.L. et Severson, C.A. "The pH of urea gels". *Arch. Biochem. Biophys.*, 104 (1964), 297-304.

Cederbaum, A.I. "Introduction : Role of lipid peroxidation and oxidative stress in alcohol toxicity". *Free Radical Biology & Medicine*, 7 (1989), 537-539.

Celis, J.E. et Bravo, R. "Cataloguing human and mouse proteins". *Trends Biochem. Sci.*, 5 (1981), 281-283.

Celis, J.E. et Bravo, R. (eds). "Two dimensionnal gel electrophoresis of proteins". Methods and applications. Academic Press (1984).

Celis, J.E., Ratz, G.P., Madsen, P., Genor, B., Lauridsen, J.B., Hansen, K.P.B., Kuee, S., Rasmussen, H.H., Nielsen, H.V., Cruger, D., Basse, B., Leffers, H., Honore, B., Moller, O. et Celis, A. "Compurized, comprehensive databases of cellular and secreted proteins from normal human embryonic lung MRC-5 fibroblasts : Identification of transformation and/or proliferation sensitive proteins". Electrophoresis, 10 (1989), 76-115.

Celis, J.E., Rasmussen, H.H., Leffers, H., Madsen, P., Honore, B., Gesser, B., Dejgaard, K. et Vandekerckhove, J. "Human cellular protein patterns and their link to genome DNA sequence data : usefulness of two-dimensional gel electrophoresis and microsequencing. The FASFB Journal, 5 (May 1991), 2200-2206.

Chiu, D., Kuyper, F. et Lubin, B. "Lipid peroxidation in human red cells". Seminars Hematology, 26 (1989), 257-276.

Choo, K.H., Cotton, R.G.H. et Danks, D.M. "Double-labelling and high precision of complex protein pattern on two-dimensional polyacrylamide gels". Anal. Bioch., 103, 33-38.

Comings, D.E. et Peters, K.E. "Two-dimensional gel electrophoresis of nuclear particles". Dans : "The cell nucleus" (Bush, H. , ed), 9, pp 89-118. Academic Press. New-York.

Corbisier, P. et Remacle, J. "Involvement of mitochondria in cell degeneration". Eur. J. Cell. Biol, 51 (1988), 173-182.

Corbisier, P., Raes, M., Michiels, C., Pigeolet, E., Houbion, A., Delaive, E. et Remacle, J. "Respiratory activity of isolated rat liver mitochondria following in vitro exposure to oxygen species : a threshold study". Mechanisms of Ageing and Developpement, 51 (1990), 249-263.

Coveney, P.V. "The second law of thermodynamics: entropy, irreversibility and dynamics". Nature (London), 333 (1988), 409-415.



Crastes De Paulet, A. "Radicaux libres et vieillissement". *Ann. Biol. Clin.* 48 (1990) 323-330.

Cristofalo, V.J. "Cellular biomarkers of aging". *Experimental Gerontology*, 23 (1988), 297-305.

Cutler, R.G. "SOD, longevity and specific metabolic rate". *Gerontology*, 29 (1983), 113-120.

Cutler, R.G. "Dysdifferentiation and aging". In: Sohal, R.S., Birnbaum, L. et Cutler, R.G. (eds) *Molecular biology of aging: gene stability and gene expression*. Raven Press, New York (1985) pp 307-340.

Cutler, R.G. "Recent progress in testing the longevity determinant and dysdifferentiation hypotheses of aging". *Arch. Gerontol. Geriatr*, 12 (1991a), 75-98.

Cutler, R.G. "Antioxidant and aging". *Am. J. Clin. Nutr*, 53 (1991b), 373S-379S.

Dice, J.F. "Altered intracellular protein degradation in aging : a possible cause of proliferative arrest". *Experimental Gerontology*, 24 (1989), 451-459.

Duncan, R. et Mc Conkey. "'How many proteins are there in a typical mammalian cell?'. *Clin. Chem.*, 28 (1982), 749-755.

Dunbar, B.S. (Ed). "Two-dimensional electrophoresis and immunological techniques". Plenum Press. New York and London (1988).

Dunn, M.J. et Burghes, A.H.M. "High resolution two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. II Analysis and applications. *Electrophoresis*, 4 (1983), 173-189.

Dusre, L., Covey, J.M., Christi, C. et Sinha, B.K. "DNA damage, cytotoxicity and free radical formation by mitomycin C in human cells". *Chemical Biological Interactions*, 71 (1989), 63-78.

Engelhardt, D.L., Lee Gloria, T.Y. et Moley, J. "Patterns of peptide synthesis in senescent and prenescent human fibroblasts". *Cell physiology*, 98 (1979), 193-198.

Francz, P.I., Bayreuther, K. et Rodemann, H.P. "Cytoplasmic, nuclear, membrane bound and secreted ( $^{35}\text{S}$ ) methionine labelled polypeptide pattern in differentiating fibroblast stem cells in vitro". *Journal of Cell Science*, 92 (1989), 231-239.

French, S.W., Katsuma, Y., Ray, M.B. et Swierenga, A. Dans : Rubin, E. (ed) *Alcohol and the Cell*, New York Academy of Sciences, New York, (1987), pp 262-273.

Garrels, J.I. "Two-dimensional gel electrophoresis and computer analysis of proteins synthesized by clonal cell lines". *J. Biol. Chem.*, 254 (1979), 7961-7977.

Goldstein, S., Ballantyne, S.R., Robson, A.L. et Moerman, E.J. "Energy metabolism in cultured human fibroblasts during aging in vitro". *Journal of Cellular Physiology*, 112 (1982), 419-424.

Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11 (1956) 298-300.

Harman, D. "Prolongation of life: role of free radical reactions in aging". *J. Amer. Geriatrics Soc*, 17 (1969), 721-731.

Harman, D. "Free radical theory of aging: origin of life, evolution, and aging". *Age*, 3 (1980), 100-102.

Harman, D. In: H. Warner, R. Butler, R.L. Sprott et E. Schneider (eds.). "Aging". Vol. 31, Raven Press, New-York (1987), 81-92.

Hayflick, L. et Moorhead, P.S. "The serial cultivation of human diploid cell stains". *Exp. Cell Res*, 25 (1961), 585-621.

Hayflick, L. "The cellular basis for biological aging". In: Hayflick, L. et Finch, C.E., (eds.) *Handbook of biological aging*. Van Nostrand Reinhold Company, New York (1977), 159-186.



Hayflick, L. "Theories of biological aging". *Experimental Gerontology*, 20 (1985), 145-159.

Hirsch, H.R. "The waste-product theory of aging: waste dilution by cell division". *Mech. Ageing Dev*, 8 (1978), 51-62.

Hirsch, H.R. "The waste-product theory of aging: cell division rate as a function of waste volume". *Mech. Ageing Dev*, 36 (1986), 95-107.

Hirsch, H.R., Coomes, J.A. et Witten, M. "The waste-product theory of aging: transformation to unlimited growth in cell cultures". *Exp. Gerontol*, 24 (1989), 97-112.

Iborra, G., et Bulher, J.M. "Protein subunit mapping. A sensitive high resolution method". *Anal. Bioch.*, 74 (1976), 503-511.

Jaffe, A.E., Hoyer, W.L. et Nachman, R.L. "Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells". *The Journal of Clinical Investigation*, 52 (1973), 2757-2764.

Kanungo, M.S. (ed.) "Biochemistry of aging"; Academic Press, New-York (1980).

Kirkwood, T.B.L. et Cremer, T. "Cytogerontology since 1881: a reappraisal of August Weismann and a review of modern progress". *Human Genetics*, 60 (1982), 101-121.

Klose, J. "Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis in mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals". *Humangenetik*, 26 (1975), 231-243.

Kohn, R.R. "Evidence against cellular aging theories". In: Adelman, R.C. et Roth, G.S. (eds.) *Testing the theories of aging*. CRC Press Boca Raton, Florida (1982b) pp. 221-231.

Kontermann, K. et Bayreuther, K. "Donor-age-related changes in the morphology, growth potential and collagen biosynthesis in rat fibroblast subpopulations in vitro". *Differentiation*, 32 (1986), 165-172.

Kontermann, K. et Bayreuther, K. "The cellular aging of rat fibroblasts in vitro is a differentiation process". *Gerontology*, 25 (1979), 261-274.

Krystal, G., Ratner, J.B. et Hamkalo, B.A. "Partial purification and characterization of the intercellular bridge from cultured mouse cells". *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 75 (1978), 4977-4981.

Lincoln, D.W., Braunschwerger, K.I., Braunschwerger, W.R. et Smith, J.R. "The two-dimensional polypeptide profile of terminally non-dividing human diploid cells". *Experimental Cell Research*, 154 (1984), 136-146.

Luce, M.C. et Bunn, C.L. "Decreased accuracy of protein synthesis in extracts from aging human diploid fibroblasts". *Exp. Gerontol*, 24 (1989), 113-118.

McConkey, E.H. "Double-label autoradiography for comparison of complex protein mixtures after gel electrophoresis". *Anal. Biochem.*, 96 (1979), 39-44.

Mac Gandy, R.B., Barrows, C.H., Meredith, A., Stone, J.L. et Norris, A.H. "Nutrients intakes and energy expenditure in men of different age". *J. Gerontol*, 21 (1966), 581-587.

Michiels, C., Raes, M., Pigeolet, E., Corbisier, P., Lambert, D. et Remacle, J. "Importance of a threshold for error accumulation in cell degenerative processes. I. Modulation of the threshold in a model of free radical-induced cell degeneration". *Mechanisms of Ageing and Development*, 51 (1990), 41-54.

Michiels, C. et Remacle, J. "Use of the inhibition of enzymatic antioxydant systems in order to evaluate their physiological importance". *European Journal Biochemistry*, 177 (1988), 435-441.



Michiels, C. et Remacle, J. "Quantitative study of natural antioxydant systems for cellular nitrofurantoin toxicity". *Biochimica and Biophysica Acta*, 967 (1988), 341-347.

Michiels, C., Toussaint, O. et Remacle, J. "Comparative study of oxygen toxicity in human fibroblasts and endothelial cells". *Journal of Cellular Physiology*, 144 (1990), 295-302.

Miller, M.J., Vo, P.K., Nielsen, C., Geiduschek, E.P. et Xuong, N.H. "Computer analysis of two-dimensional gels : semi-automatic matching". *Chemical Chemistry*, 28 (1982), 867-875.

Mollenhauer, J. et Bayreuther, K. "Donor-age-related changes in the morphology, growth potential and collagen biosynthesis in rat fibroblast subpopulations in vitro". *Differentiation*, 32 (1986), 165-172.

Nagorny, A.V., Nikitin, V.N. et Bulankin, I.N. "Problems of aging and longevity". State Publ. House Med. Lit. Moscow Russian. (1963)

Neidhart, F.C. "Report of workshop on cellular protein databases derived from two-dimensionnal polyacrylamide gel electrophoresis". *Electrophoresis*, 10 (1983), 73-75.

Ochi, T. et Miyaura, S. "Cytotoxicity of an organic hydroperoxyde and cellular antioxidant defense system against hydroperoxydes in cultured mammalian cells. *Toxicology*, 55 (1989), 69-82.

O'Farrel, P.H. "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins". *Journal of Biological Chemistry*, 250 (1975), 4007-4021.

O'Farrel, P.Z., Goodman, H.M. et O'Farrel, P. "High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell*, 12 (1977), 1133-1142.

Ohnishi, S.T., Flick, J.L. et Rubin, E. "Ethanol increases calcium permeability of heavy sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 233 (1984), 588-594.

Olson C.B. "A review of why and how we age : a defense of multifactorial aging". *Mechanisms of Ageing and Development*, 41 (1987), 1-28.

Orgel, L.E. "The maintenance of accuracy of protein synthesis and its relevance to aging". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 67 (1963) 517-521.

Orgel, L.E. "Ageing of clones of mammalian cells". *Nature (London)* 243 (1973) 441-445.

Poot, M. "Oxidant and antioxidant in proliferative senescence". *Mut. Res.*, 256 (1991), 177-190.

Prigogine, I. et Wiame, J.M. "Biologie et thermodynamique des phénomènes irréversibles". *Experientia II*, (1946), 451-453.

Rajasinghe, H., Jayatilleke, E. et Shaw, S. "DNA cleavage during ethanol metabolism : role of superoxide radicals and catalytic iron". *Life Sciences*, 47 (1990), 807-814.

Rath, P.C. et Kanungo, M.S. "Methylation of repetitive DNA sequences in the brain during aging of the rat". *Febs Letters*, 244 (1989), 193-198.

Remacle, J., Raes, M., Corbisier, P., Pigeolet, E., Michiels, C., Houbion, A. et Lambert, D. "A tentative unification of cellular theories of ageing". Dans : Robert, M. et Hofecker, G (Eds). "The theoretical basis of aging research". *Proceedings of 7th Wiener Symposium*, Facultas Verlag Wien, Wien (1990), pp 83-90.

Rodemann H.P. et Bayreuther K. "Differential degradation of (<sup>35</sup>S) methionine polypeptides in Duchene muscular dystrophy skin fibroblasts in vitro". *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 83 (1986), 2086-2090.



Rodemann, H.P., Bayreuther, K., Francz, P.I., Dittmann, K. et Albiez, M. "Selective enrichment and biochemical characterization of seven human skin fibroblasts cell types in vitro". *Experimental Cell Research*, 180 (1989), 84-93.

Schatschabel D.O. "Cell culture of human fibroblast as a model for the study of cellular aging". Dans Robert, L. et Hofecker, G. (eds). "The theoretical basis of aging research", (1990), 91-97.

Shaw S. "Lipid peroxydation, iron mobilization and radical generation induced by alcohol". *Free Radical Biology & Medicine*, 7 (1989), 541-547.

Silberman, S., McGarvey, T.W., Comrie, E. et Bruce, P. "The influence of ethanol on cell membrane fluidity, migration, and invasion of murine melona cells". *Experimental Cell Research*, 189 (1990), 64-68.

Slagboom P.E. et Vijg J. "Genetic instability and aging : theories, facts, and future perspectives". *Genome*, 31 (1989), 373-385

Sohal, R.S., Marzabadi, M.R. et Brunck, U.T. "Effect of ethanol on lipofuscin accumulation in cultured rat cardiac myocytes". *Free Radical Biology & Medicine*, 7 (1989), 611-616.

Stadtman, E.R. "Minireview : protein modification in aging". *Journal of Gerontology : Biological sciences*, 43 (1988), 112-120.

Strehler, B.L. "Time, cells and aging". Academic Press, New York, (1978).

Strehler, B.L. "Genetic instability as the primary cause of human aging". *Experimental Gerontology*, 21 (1986), 283-319.

Toussaint, O., Raes, M. et Remacle, J. "Aging as a multi-step process characterized by a lowering entropy production leading the cell to a sequence of defined stages. *Mechanisms of Ageing and Development*, 61 (1991), 41-64.

Toussaint, O., Houbion, A. et Remacle, J. "Aging as a multi-step process characterized by a lowering entropy production leading the cell to a sequence of defined

stages. II. Testing some predictions on aging human fibroblasts in culture". *Mechanisms of Ageing and Development*, 65 (1992a), 65-83.

Toussaint O. Thèse doctorale : "Approche globale du vieillissement cellulaire à partir de la théorie des systèmes ouverts". FNDP, Namur, (1992b).

Tribble, D.L., Jones, P. et Edmondson, D.E. "Effect of hypoxia on tert-butylhydroperoxide-induced oxidative injury in hepatocytes". *Molecular Pharmacology*, 34 (1988), 413-420.

Ui, N. "Isoelectric points and conformation of proteins. I. Effect of urea on the behaviour of some proteins in isoelectric focusing". *Biochim. Biophys. Acta*, 229 (1971), 567-581.

Williams, J.W., Michihiko, T., Katz, A.M. et Rubin, E. "Effect of ethanol and acetaldehyde on the ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-activated adenosine triphosphatase activity of cardiac plasma membranes". *Biochemical Pharmacology*, 24 (1975), 27-32.

Yen, T.C., Chen, Y.S., King, K.L., Yeh, S.H. et Wei, Y.H. "Liver mitochondrial respiratory functions decline with age". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 165 (1989), 994-1003.

Yuan, C., Penttilä, K.E., Alfthan, G. et Lindros, K.O. "Role of selenium-dependent glutathione peroxidase in protecting against t-butyl hydroperoxide-induced damage in hepatocytes". *Pharmacology and Toxicology*, 68 (1991), 196-200.

Zotin, A.I. et Zotina, R.S. "Experimental basis for qualitative phenomenological theory of development". In: Zotin, A.I. et Lamprecht, I., (eds.). *Thermodynamics of biological processes*. De Gruyter, Berlin (1978), 55-84.

Zotin, A.I., Zotina, R.S. et Konoplev, V.A. "Theoretical basis for qualitative phenomenological theory of development". In: Zotin, A.I. et Lamprecht, I., (eds.). *Thermodynamics of biological processes*. De Gruyter, Berlin (1978), 85-96.

Zs.-Nagy, I. et Nagy, K. "On the role of cross-linking of cellular proteins in aging". *Mech. Ageing Dev*, 14 (1978), 245-251.



ANNEXE.

Spotlist for 'tst\_G46M2'. Image size 1024 x 1024. 365 spots.

Rec_	Spotname	X	Y	II	% II	Mw
1		333	315	0.117	0.049	81659
2		360	319	0.206	0.086	80809
3		505	311	0.194	0.081	
4		624	313	0.279	0.117	
5		889	313	0.561	0.235	
6		108	372	0.000	0.000	70351
7		307	328	0.128	0.054	78930
8		307	340	0.407	0.170	76492
9		316	362	0.174	0.073	72215
10		278	378	0.230	0.096	69256
11		299	378	0.163	0.068	69256
12		315	347	0.335	0.140	75104
13		355	349	0.269	0.113	74712
14		352	371	0.174	0.073	70536
15		332	382	0.605	0.253	68536
16		332	347	0.405	0.169	75104
17		444	350	0.229	0.096	74517
18		396	342	0.236	0.099	76093
19		445	376	0.593	0.248	69619
20		432	349	0.171	0.072	74712
21		412	378	0.680	0.284	69256
22		470	378	0.986	0.413	69256
23		487	380	0.655	0.274	68895
24		500	381	0.517	0.216	
25		456	351	0.316	0.132	74323
26		507	352	0.210	0.088	
27		469	365	0.620	0.259	71651
28		541	342	0.154	0.064	
29		598	328	0.568	0.238	
30		627	353	0.195	0.082	
31		666	372	0.593	0.248	
32		680	371	0.788	0.330	
33		819	346	0.017	0.007	
34		273	425	0.041	0.017	61247
35		296	436	0.715	0.299	59510
36		313	444	0.075	0.031	58278
37		267	393	1.119	0.468	66592
38		293	397	0.270	0.113	65900
39		365	387	0.989	0.414	67645
40		331	400	2.570	1.075	65385
41		379	404	5.233	2.189	64704
42		333	421	0.099	0.041	61891
43		371	428	3.443	1.440	60768
44		359	443	0.298	0.125	58431
45		447	387	1.166	0.488	67645
46		435	396	1.769	0.740	66072
47		393	444	0.454	0.190	58278
48		426	395	0.629	0.263	66245
49		443	441	0.450	0.188	58737
50		441	432	0.253	0.106	60136
51		461	442	2.280	0.954	58584
52		476	443	4.808	2.012	58431
X 53		499	430	0.203	0.085	97550
54		529	391	0.446	0.187	
55		515	396	0.302	0.126	
56		572	409	0.325	0.136	
57		593	409	0.483	0.202	
58		637	433	0.551	0.231	95361
59		625	433	0.172	0.072	95361
60		631	415	0.056	0.023	
61		694	420	0.194	0.081	



62	680	425	0.402	0.168	
63	681	436	0.060	0.025	93220
64	658	424	0.105	0.044	
65	669	445	0.048	0.020	87084
66	741	396	0.311	0.130	
67	722	421	0.067	0.028	
68	761	426	0.062	0.026	
69	706	426	0.122	0.051	
70	747	426	0.107	0.045	
71	761	435	0.201	0.084	93928
72	724	397	0.032	0.013	
73	710	394	0.020	0.008	
74	822	394	1.220	0.510	
75	802	395	0.274	0.115	
76	825	413	0.113	0.047	
77	807	433	0.296	0.124	95361
78	784	395	0.017	0.007	
79	831	428	0.051	0.021	
80	862	439	0.098	0.041	91128
81	895	422	0.049	0.021	
82	904	435	0.583	0.244	93928
83	896	412	0.067	0.028	
84	896	422	0.046	0.019	
85	254	510	0.602	0.252	49041
86	260	448	0.022	0.009	57672
87	287	449	0.089	0.037	57521
88	278	451	0.243	0.102	57221
89	302	455	0.017	0.007	56626
90	265	458	0.249	0.104	56184
91	292	465	0.021	0.009	55164
92	276	466	1.741	0.728	55020
93	268	481	0.197	0.082	52904
94	318	480	1.499	0.627	53043
95	290	485	0.053	0.022	52354
96	308	504	0.254	0.106	49816
97	278	487	0.105	0.044	52081
98	329	453	0.217	0.091	56923
99	343	454	0.431	0.180	56774
100	375	465	1.330	0.556	55164
101	377	477	0.447	0.187	53460
102	332	484	0.310	0.130	52491
103	357	478	0.348	0.146	53321
104	359	504	4.900	2.050	49816
105	412	467	0.507	0.212	54877
106	431	468	0.388	0.162	54733
107	437	476	0.306	0.128	53600
108	393	489	15.716	6.575	51809
109	385	497	1.700	0.711	50736
110	399	499	6.431	2.691	50472
111	393	466	0.398	0.167	55020
112	473	469	0.854	0.357	54591
113	459	476	2.085	0.872	53600
114	499	476	0.702	0.294	68876
115	478	480	0.492	0.206	53043
116	476	493	0.145	0.061	51270
117	492	493	0.224	0.094	60563
118	466	504	0.329	0.138	49816
119	506	448	0.943	0.395	85129
120	511	456	0.678	0.284	80129
121	537	452	0.565	0.236	82591
122	548	459	0.138	0.058	78330
123	567	462	0.088	0.037	76572
124	568	478	0.054	0.023	67841
125	516	482	0.946	0.396	65819
126	531	484	0.150	0.063	64830
127	547	485	0.564	0.236	64342

128	525	495	0.127	0.053	59653
129	565	495	0.446	0.187	59653
130	574	502	0.164	0.069	56576
131	522	448	3.619	1.514	85129
132	541	477	0.048	0.020	68357
133	622	461	0.110	0.046	77154
134	619	476	0.329	0.138	68876
135	591	478	0.168	0.070	67841
136	587	497	1.309	0.548	58757
137	629	502	0.680	0.284	56576
138	664	469	0.098	0.041	72622
139	691	469	1.489	0.623	72622
140	685	490	1.019	0.426	61953
141	678	504	0.500	0.209	55726
142	656	493	0.233	0.097	60563
143	696	455	0.142	0.059	80737
144	718	459	0.111	0.046	78330
145	731	461	1.041	0.436	77154
146	763	463	1.331	0.557	75995
147	711	467	0.188	0.079	73730
148	745	466	0.351	0.147	74290
149	722	476	0.272	0.114	68876
150	761	478	0.008	0.003	67841
151	713	485	0.044	0.018	64342
152	745	498	0.207	0.087	58314
153	760	504	0.258	0.108	55726
154	743	504	0.483	0.202	55726
155	810	462	0.022	0.009	76572
156	831	460	0.122	0.051	77740
157	791	465	0.527	0.220	74854
158	800	479	0.017	0.007	67330
159	811	490	0.346	0.145	61953
160	830	499	0.867	0.363	57875
x 161	777	503	2.785	1.165	56149
162	822	508	0.298	0.125	54065
163	891	474	0.033	0.014	69926
164	832	476	0.002	0.001	68876
165	844	488	1.164	0.487	62898
166	315	522	0.345	0.144	47527
167	312	541	0.912	0.382	45234
168	290	548	0.153	0.064	44418
169	299	560	0.392	0.164	43052
170	317	563	0.406	0.170	42717
171	279	574	0.205	0.086	41511
x 172	259	549	0.874	0.366	44302
173	261	532	0.986	0.413	46306
x 174	279	533	1.410	0.590	46186
175	353	518	1.782	0.746	48025
176	333	529	0.912	0.382	46669
177	370	550	0.812	0.340	44187
178	357	571	0.186	0.078	41837
179	339	519	0.509	0.213	47900
180	386	516	2.326	0.973	48277
181	417	521	0.938	0.392	47651
x 182	439	524	0.623	0.261	47281
183	396	522	2.595	1.086	47527
184	411	529	0.276	0.115	46669
185	423	540	1.249	0.523	45352
186	435	550	2.026	0.848	44187
187	404	553	2.965	1.240	43843
188	420	569	0.465	0.195	42055
189	436	575	0.133	0.056	41403
190	397	539	0.307	0.128	45470
191	424	557	4.139	1.732	43389
192	450	538	1.418	0.593	45589
193	473	541	2.642	1.105	45234



194	499	543	0.042	0.018	45540
195	505	570	0.026	0.011	42386
196	466	527	0.344	0.144	46913
197	474	521	0.095	0.040	47651
198	448	560	5.390	2.255	43052
199	462	559	3.529	1.476	43164
200	480	554	4.637	1.940	43729
201	462	551	5.672	2.373	44072
202	500	556	1.013	0.424	43993
203	521	561	0.879	0.368	43412
204	542	572	0.068	0.028	42161
205	534	522	0.056	0.023	48630
206	526	534	0.040	0.017	46643
207	570	529	0.062	0.026	47267
208	565	574	0.565	0.236	41937
209	584	514	0.133	0.056	51665
210	617	516	1.048	0.438	50889
211	594	530	0.582	0.243	47142
212	633	532	0.263	0.110	46892
213	614	538	0.373	0.156	46150
214	631	543	0.346	0.145	45540
215	618	558	0.856	0.358	43760
216	637	558	0.281	0.118	43760
217	605	558	0.106	0.044	43760
218	673	533	0.568	0.238	46767
219	689	536	0.288	0.120	46396
220	660	556	0.557	0.233	43993
221	680	557	0.062	0.026	43876
222	692	566	0.390	0.163	42839
223	758	515	0.255	0.107	51276
224	760	529	0.012	0.005	47267
225	714	538	0.457	0.191	46150
226	764	551	0.042	0.018	44582
227	717	550	0.411	0.172	44701
228	736	556	0.110	0.046	43993
229	720	558	0.151	0.063	43760
230	725	575	0.359	0.150	41826
231	759	543	0.082	0.034	45540
232	718	513	0.069	0.029	52057
233	779	521	0.009	0.004	49000
234	817	527	1.296	0.542	47519
235	809	545	0.008	0.003	45299
236	781	556	0.053	0.022	43993
237	808	575	0.673	0.282	41826
238	880	522	3.728	1.560	48630
239	846	563	0.077	0.032	43182
240	865	541	0.134	0.056	45783
241	877	559	0.025	0.010	43644
242	319	577	0.085	0.036	41189
243	292	592	4.153	1.738	39611
244	269	599	0.018	0.008	38896
245	292	610	0.033	0.014	37799
246	297	621	0.147	0.062	36732
247	297	635	1.841	0.770	35417
248	373	580	0.036	0.015	40868
249	377	589	0.076	0.032	39922
250	333	597	0.936	0.392	39099
251	358	619	0.067	0.028	36923
252	373	623	0.048	0.020	36541
253	356	632	0.004	0.002	35695
254	329	624	0.023	0.010	36446
255	386	579	0.069	0.029	40975
256	387	600	0.089	0.037	38795
257	446	623	0.066	0.028	36541
x 258	423	635	2.095	0.876	35417
259	394	629	0.114	0.048	35975

260	398	634	0.091	0.038	35510
261	414	604	0.087	0.036	38393
262	446	602	0.088	0.037	38594
263	461	576	0.620	0.259	41296
264	465	585	0.348	0.146	40340
265	467	621	0.041	0.017	36732
266	509	632	0.199	0.083	35695
267	508	620	0.077	0.032	36827
268	520	583	0.003	0.001	40946
269	530	594	0.249	0.104	39765
270	565	595	0.144	0.060	39660
271	517	606	0.119	0.050	38517
272	570	626	0.590	0.247	36522
273	613	596	0.005	0.002	39554
274	618	611	0.080	0.033	38008
275	630	628	0.004	0.002	36328
276	700	582	0.079	0.033	41055
277	690	609	0.159	0.067	38211
278	652	629	0.066	0.028	36232
279	743	579	0.031	0.013	41383
280	757	586	0.011	0.005	40620
281	767	599	0.022	0.009	39240
X 282	763	609	0.804	0.336	38211
283	744	610	0.787	0.329	38109
284	719	628	0.005	0.002	36328
285	718	603	0.009	0.004	38825
X 286	807	584	0.145	0.061	40837
X 287	783	585	0.323	0.135	40728
X 288	779	611	0.378	0.158	38008
X 289	791	614	0.436	0.182	37706
X 290	829	617	0.194	0.081	37406
291	826	627	0.723	0.302	36425
292	870	638	0.004	0.002	35375
293	905	635	1.415	0.592	35658
294	314	656	0.082	0.034	33534
295	286	654	1.397	0.584	33709
296	299	658	1.517	0.635	33359
297	296	670	2.148	0.899	32331
298	291	700	0.416	0.174	29893
299	315	688	3.088	1.292	30845
300	362	652	7.148	2.991	33884
301	381	655	0.059	0.025	33621
302	327	692	5.368	2.246	30525
X 303	445	640	0.559	0.234	34959
304	405	657	0.219	0.092	33446
305	387	668	0.303	0.127	32500
306	412	669	2.056	0.860	32415
307	434	669	0.224	0.094	32415
308	419	683	0.073	0.031	31251
309	446	682	0.116	0.049	31333
310	408	693	0.066	0.028	30445
311	505	691	0.685	0.287	30605
312	473	678	0.029	0.012	31662
313	471	690	0.032	0.013	30685
X 314	555	663	0.263	0.110	33100
315	594	657	0.017	0.007	33632
316	587	681	0.001	0.000	31553
317	603	687	0.125	0.052	31053
318	577	666	0.007	0.003	32837
319	680	684	0.262	0.110	31302
320	703	673	0.011	0.005	32231
321	715	666	0.070	0.029	32837
322	712	699	0.045	0.019	30078
323	796	699	0.198	0.083	30078
324	821	657	0.009	0.004	33632
325	308	737	0.077	0.032	26988



326	365	705	2.310	0.966	29505
x 327	324	716	0.718	0.300	28669
328	380	719	0.082	0.034	
x 329	361	733	0.551	0.231	27321
330	324	739	2.035	0.851	26823
331	415	710	0.016	0.007	29122
332	461	715	0.472	0.197	28744
333	492	719	0.775	0.324	
334	533	706	0.018	0.008	
335	550	721	0.050	0.021	28346
336	526	748	0.040	0.017	26093
337	544	739	0.075	0.031	26823
338	626	708	0.022	0.009	29367
339	661	705	0.005	0.002	29602
340	673	712	0.001	0.000	29056
341	674	742	0.123	0.051	26578
x 342	648	736	0.003	0.001	27071
343	699	740	0.319	0.133	26741
344	689	754	0.006	0.003	25617
345	814	712	0.038	0.016	29056
346	788	763	0.001	0.000	24920
347	843	713	0.000	0.000	28979
348	299	777	0.155	0.065	23873
349	317	799	0.456	0.191	22315
350	290	804	0.452	0.189	21976
351	302	816	0.455	0.190	21182
352	280	799	0.205	0.086	22315
353	338	788	0.017	0.007	23081
354	481	773	0.132	0.055	24168
355	527	792	0.022	0.009	22800
356	602	813	0.005	0.002	21378
357	664	823	0.021	0.009	20732
358	714	821	0.041	0.017	20860
359	716	804	0.013	0.005	21976
360	858	789	0.000	0.000	23010
361	838	793	0.000	0.000	22730
x 362	255	884	1.257	0.526	
363	366	834	0.122	0.051	20044
364	400	838	0.932	0.390	19800
365	568	838	0.000	0.000	19800